



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 6 C12N 15/00	A1	(11) 国際公開番号 WO 95/05457  (43) 国際公開日 1995年2月23日 (23.02.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01352 (22) 国際出願日 1994年8月16日 (16. 08. 94)  (30) 優先権データ 特願平5/226454 1993年8月19日 (19. 08. 93) JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP] 〒140 東京都品川区東品川四丁目12番62号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 日吉 徹 (HIYOSHI, Toru) [JP/JP] 峯 利喜 (MINE, Toshiki) [JP/JP] 〒438 静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka, (JP) 笠岡啓介 (KASAOKA, Keisuke) [JP/JP] 〒140 東京都品川区東品川四丁目12番62号 日本たばこ産業株式会社 アグリ事業部内 Tokyo, (JP) タイソン ヒュー ロバート (TYSON, Huw Robert) [GB/GB] ページ マイルズ ジョン アンソニー (PAGE, Miles John Anthony) [GB/GB] シービー2 4エージー ケンブリッジ ベイブラハム アクシス ジェネティックス リミテッド内 Cambridge, (GB)		(74) 代理人 弁理士 谷川英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP)  (81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : DNA CODING FOR PLANT-DERIVED ATP-DEPENDENT FRUCTOSE-6-PHOSPHATE 1-PHOSPHOTRANSFERASE, RECOMBINANT VECTOR CONTAINING THE SAME, AND METHOD OF CHANGING SUGAR CONTENT OF PLANT CELL BY USING THE VECTOR AT LOW TEMPERATURE (54) 発明の名称 植物由来のATP依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼをコードするDNA、それを含む組換えベクター及びそれを用いる低温下で植物細胞中の糖含量を変化させる方法  <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="186 1312 649 1722"> <p>RB, LB ... right and left boundary regions of T-DNA of <i>Agrobacterium tumefaciens</i></p> <p>nosP ... promoter of nopaline synthase gene of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (0.3 kb)</p> <p>NPTII ... neomycin phosphotransferase gene imparting kanamycin resistance (1.2 kb)</p> <p>nosT ... polyadenylation signal of nopaline synthase of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (0.3 kb)</p> <p>CAMV 35S ... 35S promoter of cauliflower mosaic virus (0.8 kb)</p> <p>PFKd ... cold-resistant PFK gene of potato "Brodick" (1.8 kb)</p> </div> <div data-bbox="673 1491 1266 1764"> <p>RB, LB: アグロバクテリウム・ツメファシエンシスのT-DNAの左右境界領域</p> <p>nosP: アグロバクテリウム・ツメファシエンシスのノパリンシンターゼ遺伝子のプロモーター (0.3 kb)</p> <p>NPTII: カナマイシン抵抗性を与えるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (1.2 kb)</p> <p>nosT: アグロバクテリウム・ツメファシエンシスのノパリンシンターゼのポリアデニレーションシグナル (0.3 kb)</p> <p>CAMV 35S: カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター (0.8 kb)</p> <p>PFKd: バレイショ品種Brodickの低温耐性PFK遺伝子 (1.8 kb)</p> </div> <div data-bbox="1104 1155 1429 1491"> </div> </div>		
(57) Abstract <p>The invention discloses a DNA coding for a cold-resistant PFK, a recombinant vector capable of expressing a cold-resistant PFK in a host cell, and a method of changing the sugar content of a plant cell by using the vector at low temperature. The invention provides a DNA coding for a plant-derived ATP-dependent fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase, a recombinant vector containing the DNA and capable of expressing a plant-derived ATP-dependent fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase in a plant cell, and a method of changing the sugar content of a plant cell at low temperature by transforming a plant with the vector.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

低温耐性P F KをコードするDNA、低温耐性P F Kを宿主細胞内で発現することができる組換えベクター及び該組換えベクターを用いて低温下で植物細胞中の糖含量を変化させる方法が開示されている。本発明は、植物由来のA T P依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼをコードするDNA、該DNAを含み、宿主細胞内で植物由来のA T P依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼを発現することができる組換えベクター、及び該組換えベクターで植物を形質転換することから成る、低温下で植物細胞中の糖含量を変化させる方法を提供した。

情報としての用途のみ

P C Tに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にP C T加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
BB	バルバドス	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BE	ベルギー	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BF	ブルキナ・ファソ	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェッコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュー・ジーランド	VN	ヴェトナム

## 明細書

植物由来のATP依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼをコードするDNA、それを含む組換えベクター及びそれを用いる低温下で植物細胞中の糖含量を変化させる方法

## 技術分野

本発明は、植物由来のATP依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼ (EC 2.7.1.11) (以下、「PFK」という) をコードするDNA、それを含む組換えベクター及び該組換えベクターを用いて低温下で植物細胞中の糖含量を変化させる方法に関する。

## 背景技術

PFKは、解糖系の律速反応を触媒し、フルクトース6リン酸 (以下F6Pと称する) をフルクトース1, 6二リン酸にリン酸化する酵素である。

植物組織を低温下に晒すと一般にスクロース、グルコース、フルクトース等の糖含量が増加することが知られている。例えば、バレイショ塊茎もその例外ではないが、塊茎低温貯蔵中に生じるグルコース、フルクトースといった還元糖の蓄積はポテトチップ加工時の過度の褐変の原因になり産業上好ましくない。この還元糖蓄積が生じる原因については様々な仮説があるが、低温下では解糖系活性が著しく低下し、その結果、デンプン分解物のスクロース合成系側への流入が促進され、それが原因で還元糖が蓄積すると考えられている。解糖系はPFKによって律速され、且つPFKは低温に弱い酵素であることが広く知られていることから、低温下における解糖系活性の著しい低下の原因は、PFKの著しい活性低下に起因すると考えられている。

PFK遺伝子単離に関しては、大腸菌、好熱菌、枯草菌及びマイコプラズマ等の原核生物由来のもの並びにヒト筋肉、ヒト肝臓、ウサギ筋肉及びマウス肝臓等の真核生物組織由来のものが論文で報告されている。しかしながら植物PFK遺伝子の単離報告はない。また低温耐性PFKをコードしている遺伝子を単離したという報告もない。それ故、従来技術では、低温耐性PFK遺伝子導入による低温低糖性バレイショの作出、あるいはPFKアンチセンスRNAを発現させ植物組織内の解糖系活性を抑制することによって、糖含量の高い新しい味覚を有する

作物を作出することができない。

植物に P F K 遺伝子を導入した例として欧州特許公開第 0 438 904 号（特開平 4-341126 号公報）がある。この公開公報に記載された発明では、大腸菌 P F K 遺伝子をバレイショ、イネで発現させ、糖代謝系の中間代謝物量に変化が生じることを示した。特に、バレイショでは収穫直後の塊茎中のスクロース含量が減少することを示した。しかし、この公報記載の発明では、加工用バレイショで産業上問題となる低温貯蔵下の塊茎中のグルコース、フルクトース量の減少については述べられていない。大腸菌 P F K が低温下で不安定な酵素であること（Kruger, N. J. (1989) Biochemical Society Transaction 629th Meeting, London Vol. 17 760-761）を考慮すれば、大腸菌 P F K 遺伝子をバレイショに導入し、塊茎で発現させる方法では低温低糖性バレイショ品種を作出できないことは容易に想像が付く。本目的を達成するには低温耐性 P F K をコードする遺伝子が必要である。しかし、低温耐性 P F K 遺伝子を単離したという従来技術はない。

収穫後のバレイショ塊茎を低温貯蔵することは、病気、発芽、老化を抑制し長期保存するうえで非常に重要である。しかし、低温貯蔵した塊茎をポテトチップやフレンチフライの原料として直接使用する場合、加工中に過度の褐変を生じ製品（特にポテトチップ）の商品価値が著しく低下する。この褐変は、塊茎中に含まれるアミノ酸と還元糖が高温の油で加工する際に生じるメイラード反応によって起こることが知られている（Schallenberger, R. S. et al., (1959) J. Agric. Fd Chem., 7, 274）。塊茎を低温貯蔵すると塊茎中の還元糖（グルコース・フルクトース）量が増加し、塊茎中のグルコース・フルクトース量と製品の褐変度の間に高い相関が見られることが知られており、低温貯蔵中のグルコース・フルクトース量の増加が、加工中に過度の褐変を生じる主要因と考えられている（Gray, D and Hughes, J. C. (1978) The Potato Crop (ed. P. M. Harris), Chapman & Hall, London, pp. 504-544）。

現在、ポテトチップ加工業者は発芽抑制剤を併用し 8℃前後（品種により異なる）の低温で貯蔵した塊茎を原料として用いている。しかし、許容範囲を越える還元糖の蓄積があり、加工前にブランチングあるいはリコンディショニングと呼ばれる処理をし、塊茎組織の還元糖量を減らしてから使用している。これらの処

理は費用や手間が掛かり、現在使用されている貯蔵温度で還元糖を蓄積しないバレイショ新品種が作出されれば、それは加工業者にとってコスト低減につながるという利点がある。さらに、2～4℃という低温貯蔵下で還元糖を蓄積しにくいバレイショ品種を作出できれば、ブランチングやリコンディショニングといった加工前処理に費やす手間や費用を節減できるだけでなく、老化あるいは乾物重ロスの原因となる発芽を抑制でき、安全性に問題のある発芽抑制剤を使用せずに塊茎の長期保存が可能になる。そうした意味で低温低糖性のバレイショ品種の作出に対する加工業者の要求は強い。

この問題となる低温貯蔵中のグルコース・フルクトース量の増加は、低温下での塊茎中の様々な生理的変化により生じるが、そのなかでも、解糖系の律速酵素と言われるPFKの低温下での著しい活性低下が主要な原因であると考えられている (Dixon, W.L. and ap Rees, T. (1980) *Phytochem.*, 19, 1653; Dixon, W.L. et al., (1981) *Phytochem.*, 20, 969; Pollock, C.J. and ap Rees, T. (1975) *Phytochem.*, 14, 613)。低温貯蔵中の塊茎では、還元糖はデンプンの分解により供給されると考えられ、その代謝過程でF 6 Pを経由する。F 6 Pを基質とする生体反応には大きく分けて2つある。1つはF 6 Pを解糖系へ流すPFKに触媒される反応、もう1つはF 6 Pをスクロース合成系へ流すスクロース6リン酸合成酵素 (以下SPSと称する) (EC. 2.4.1.14) に触媒される反応である。つまりこの2酵素は基質のF 6 Pを巡って競合関係にある。収穫後常温で貯蔵したバレイショ塊茎では、発芽や老化を起こさない限り通常グルコースとフルクトースの蓄積量は非常に少ない。これはPFKがSPSとの競合で勝り、F 6 Pの大部分が解糖系側に流れ込むためと考えられる。しかし、低温下ではPFKの酵素活性が著しく低下し、SPSがPFKとの競合に勝り、F 6 Pは解糖系よりもスクロース合成系に優先的に流れ込むようになる。そしてスクロースは最終的にインベルターゼ (EC. 3.2.1.26) の働きによってグルコースとフルクトースになり蓄積すると考えられている。このようにPFKの活性低下に起因する解糖系活性の減少が、低温貯蔵中にバレイショ塊茎中のグルコースとフルクトース量を増加させる原因と考えられている。この仮説を裏付けるように、Hammond等 (*Planta* 180, 613-616. 1990) は、スコットランド作物研究所で作出された低

低温低糖性品種の塊茎には低温貯蔵中に還元糖含量が増加する通常品種にはない低温耐性P F Kが存在することを報告しており、塊茎中のP F Kの低温耐性の強弱が低温貯蔵中のグルコース、フルクトース量を決定する主要因である可能性が示されている。

もし、低温耐性P F KをコードするDNAが得られれば、それをバレイショに導入し低温貯蔵中の塊茎で発現させることにより解糖系活性を高めることができ、その結果、還元糖量の少ない低温低糖性バレイショを作出できる。これにより、加工業者は糖含量を低下させるために現在行っているブランチングやリコンディショニング処理に費やしているコストを節約できる。

#### 発明の開示

従って、本発明の目的は、低温耐性P F KをコードするDNAを提供することである。さらにまた、本発明の目的は、低温耐性P F Kを宿主細胞内で発現することができる組換えベクターを提供することである。さらに、本発明の目的は、該組換えベクターを用いて植物を形質転換することにより低温下で植物細胞中の糖含量を変化させる方法を提供することである。

本願発明者らは、上記目的を達成するために、低温耐性P F Kを有する植物組織、具体的にはバレイショ品種Brodickの塊茎に由来するP F Kのアイソザイムの1つをコードする相補的遺伝子（cDNA、翻訳領域及び非翻訳領域を含む）の単離並びに構造解明を試みた結果、これに成功し、且つ本遺伝子が大腸菌およびバレイショ塊茎中で低温耐性P F Kを発現させることを確認し、且つ本遺伝子が発現させたバレイショの低温貯蔵塊茎中のグルコース含量の減少およびそれを材料として調製したポテトチップの色の改善を確認し、且つ本遺伝子をプローブとして種々植物P F K遺伝子の単離に成功し、且つ種々植物P F Kに特異的で且つ共通に存在するアミノ酸配列を同定し本発明を完成した。

すなわち、本発明は、植物由来のP F KをコードするDNAを提供する。また、本発明は、上記本発明のDNAを含み、宿主細胞内で配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を発現することができる組換えベクターを提供する。さらに、本発明は、上記本発明の組換えベクターで植物を形質転換することから成る、低温下で植物細胞中の糖含量を変化させる方法を提供す

る。さらに、本発明は、配列表の配列番号 11、14、21 又は 22 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA を提供する。さらにまた、本発明は、配列表の配列番号 11 ないし 22 で示されるアミノ酸又はその部分をコードする DNA 及び配列表の配列番号 11 ないし 22 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA を含む DNA のいずれかと試料 DNA とをハイブリダイズさせることから成る、植物由来の PFK 遺伝子の検出方法を提供する。さらにまた、本発明は、配列表の配列番号 11 ないし 22 で示されるアミノ酸又はその部分をコードする DNA 及び配列表の配列番号 11 ないし 22 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA を含む DNA のいずれかを PCR のためのプライマーとして用いて植物由来の ATP 依存フルクトース 6 リン酸 1 ホスホトランスフェラーゼ遺伝子を増幅する方法を提供する。

本発明により、低温耐性 PFK をコードする DNA およびそれを含むベクターが初めて提供された。本発明の組換えベクターを植物に遺伝子工学的に導入し発現させることにより、低温下に置かれた塊茎組織でグルコース含量を非形質転換体に比べ減少させることが可能であり、特に植物、その中でもバレイショで低温低糖性品種の開発に利用できる。また、本発明により初めて提供された種々植物 PFK 遺伝子の DNA 塩基配列は、植物 PFK 遺伝子の単離にプローブとして利用するのが非常に難しい他生物由来の PFK 遺伝子と異なり、植物 PFK 遺伝子単離に広く利用できる。さらに、単離された種々植物 PFK 遺伝子の塩基配列を利用して、アンチセンス RNA を発現させる方法等により、植物細胞中の PFK 活性を抑制することが可能になる。例えば糖代謝を改変したり、呼吸を減少させることが可能で、より多く糖を蓄積する甘い果物や野菜を作出できる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の組換えベクターで形質転換された大腸菌 No. 58 株と、対照の大腸菌 No. 1 株の IPTG 添加後における PFK 活性の誘導の時間変化を示す図である。

図 2 は、本発明の組換えベクターで形質転換された大腸菌 No. 58 株の PFK 活性の免疫滴定実験の結果を示す図である。

図 3 は、本発明の組換えベクターで形質転換された大腸菌 No. 58 株から精製し

たP F KのS D S - P A G Eによる解析とウェスタンプロット解析の結果を示す図である。

図4は、低温耐性P F K - d遺伝子を含む発現ベクターを示す図である。

図5は、系統B 7 5及び系統B 4 0の貯蔵塊茎からのR N Aのノーザンブロット分析の結果を示す図である。

図6は、系統B 7 5及び系統B 4 0の貯蔵塊茎からの粗抽出液のウェスタンプロット分析の結果を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

上述のように、DNAは植物P F Kをコードするものであり、その具体例であるバレイショ (*Solanum tuberosum* L.)、フラベリア (*Flaveria brownii*)、イネ (*Oryza sativa*)、トウモロコシ (*Zea mays*)、ラディッシュ (*Raphanus sativus*) P F KコードDNAは、各々下記配列表の配列番号2、4、6、8、10で示されるアミノ酸配列をコードする。このようなDNAの具体例として、下記実施例において実際にクローニングされ、塩基配列が決定された、配列表の配列番号1、3、5、7、9で示されるDNAを挙げることができるがこれに限定されるものではない(なお、配列番号2、4、6、8、10のアミノ酸配列は各々配列番号1、3、5、7、9に示されているアミノ酸配列と同じである)。特に、配列番号1、3、5、7、9で示されるものはc DNAであるが、本発明により、植物P F Kのアミノ酸配列及びこれをコードするDNAの塩基配列が明らかにされたので、これらの塩基配列の両端部分をプライマーとして用い、ゲノミックDNAを鋳型として用いたP C R法により、配列番号2、4、6、8、10で示されるアミノ酸配列をコードするゲノミックDNAを容易に調製することができる。従って、このようなゲノミックDNA(イントロン部分を含み得る)も本発明の範囲に入るものと解釈する。

上記した、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNAや、配列番号1で示される塩基配列を有するDNAがコードする植物P F Kは、後述の実施例で具体的に示されるように、5℃におけるQ 1 0値(後述)が2.4以下である。5℃においてQ 1 0値が2.4以下であるP F Kは低温耐性を有すると言える。



本発明のDNAは、例えば次のような方法により得ることができる。

まず、植物組織よりPFKに対応するポリ(A) + RNAを分離する際には、まず分解を受けていない全RNAを単離することが望ましい。また、低温耐性PFKを有することが知られている植物組織、具体的にはバレイショ低温低糖性品種Brodictの低温貯蔵塊茎を材料に用いるのが望ましい。

バレイショ塊茎より全RNAを単離する方法としては、例えばドデシル硫酸ナトリウム(SDS)／フェノール法などがある。調製した全RNAからPFKポリ(A) + RNAを得るには、ダイナビーズmRNA精製キット(DYNAL)などを用いることができる。この処理によって直接PFKポリ(A) + RNAを単離することは容易でないので、得られたポリ(A) + RNA集団を鋳型としてcDNAを作成し、これらを有する微生物集団(cDNAライブラリー)を作成することが望ましい。具体的には、GublerとHoffmanの方法(Gene, 25:263, 1983)等により2本鎖cDNAを合成し、アダプターDNAを介してDNAリガーゼにより適当なベクターに結合させ、宿主となる微生物を形質転換させ、cDNAライブラリーを作成する。ここで用いるベクターとしては、大腸菌を宿主とする場合、pUC系あるいはλファージ系のものが利用しやすい。しかし、最も効率的に当該遺伝子をスクリーニングするには、バレイショ品種Brodict塊茎ポリ(A) + RNAより合成された2本鎖cDNAを制限酵素Eco RIとNot Iの認識部位を有するアダプターDNAを介してλgt10ファージベクターのEco RI部位にDNAリガーゼにより結合させた後、ファージ粒子を形成させ、cDNAライブラリーを作成すれば良い。次いで、このcDNAライブラリーからPFKポリ(A) + RNAに対応するcDNAクローンを同定する。

PFK cDNAクローンの同定は、精製した植物PFKの部分アミノ酸配列の決定に基づいて合成したオリゴヌクレオチド、あるいはこれらオリゴヌクレオチドをプライマーとし植物ゲノムDNAあるいはcDNAを鋳型としてポリメラーゼチェーン反応(PCR)によって増幅したPFK遺伝子の塩基配列の一部を有するDNAをプローブに用い、ブランクハイブリダイゼーション法によって行うことができる。

次に、バレイショ塊茎PFKコードDNAを有する形質転換体をプレートライ

セート法等により大量培養し、常法、例えばSambrook等の方法（Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）によりファージDNAを精製し、さらに、制限酵素Not 1で消化後、アガロース電気泳動等を行うことにより、PFKをコードするcDNAを得ることができる。さらに、バレイショPFK遺伝子が一旦単離されたならば、この単離されたPFK遺伝子若しくはその一部をプローブとして用いることにより、又はその一部をPCR用のプライマーとして用いることにより種々の植物からPFK遺伝子を容易に単離することができる。

下記実施例に記載するように、種々の植物のPFK遺伝子のcDNAがクローニングされ、その塩基配列及び推定アミノ酸配列が決定された。種々の植物のPFK遺伝子のアミノ酸配列を比較することにより、植物PFKに共通な、5個以上のアミノ酸残基を有する13種のアミノ酸配列が同定された。従って、これらの配列若しくはその一部をコードする核酸又はこれらの配列をコードする領域を含む核酸であって、所望のPFK遺伝子とハイブリダイズするものをプローブ又はPCR用プライマーとして用いることにより種々の植物のPFK遺伝子を検出又は増幅することができる。表7に示すアミノ酸配列をコードするDNAは容易に化学合成できる。表7に示す配列のうち、配列(1)、(4)、(11)及び(12)（すなわち、配列表の配列番号11、14、21及び22）は植物のPFKに共通するが植物以外の生物のPFKには見られないものである。従って、これらの配列を用いることにより、他の生物由来のPFKが混入する可能性を排除して植物PFKを検出又は増幅することができる。プローブとしては、ヌクレオチド数15以上、遺伝子の全長以下の長さのものが好ましい。オリゴヌクレオチドを放射マーカー又は蛍光マーカー等で標識する方法はこの分野において周知である。また、PCR用のプライマーとしては、ヌクレオチド数15ないし30のものが好ましい。

このようにして得られるPFK cDNAの利用方法としては、まず第一に、これを微生物、植物および動物のベクター等に組み込んで微生物、植物および動物を形質転換し組織中のPFK活性を増大できることである。さらに別の利用法として、PFK cDNAを逆向きにベクターに挿入し、バレイショ等の植物組織中

で発現させ、本来植物が有する P F K 活性を抑制できることである。

ここで、微生物としては大腸菌等のエスケリッチア属等の細菌やパン酵母等のサッカロミセス属等の酵母がある。また、植物としては主としてアグロバクテリウム属細菌-R i /T i プラスミド系による形質転換が可能な双子葉植物、例えばバレイショ、タバコ、トマト等に代表されるナス科植物、メロン、キュウリ等のウリ科植物、ダイコン、ナタネ等のアブラナ科植物、ブドウ、柑橘類等の果樹類が挙げられる。その他、P E G-リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルボンバードメント法等による形質転換が可能な植物としては、イネ、トウモロコシ等に代表されるイネ科植物等の単子葉植物がある。動物では、ヒト、マウス等の各種培養細胞 (BALB/c-3T3等) が挙げられる。これらの宿主に使用されるベクターを以下に例示する。

文献 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等) に記載の各種プラスミドベクター (pBR322、pUC 系プラスミド等) およびファージベクター ( $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11、 $\lambda$ ZAP 等) などがあり、酵母、動物細胞のベクターとしては、文献 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等) に記載の各種ベクターが挙げられる。植物のベクターとしては、通常クローニングに用いられるプラスミド由来の各種ベクターやバイナリーベクター (pGA482、pBin19等) などの T i プラスミド由来のベクター類が挙げられる (文献: An, G. et al (1986) Plant Physiol. 81, 301; Bevan, M., (1984) Nucleic Acids Research 12, 8711 等)。但し、T i プラスミド由来の植物ベクターの場合は、得られた組換え DNA を一旦アグロバクテリウム・ツムファシエンス等 (LBA4404 等) のアグロバクテリウム属の細菌に導入し、本組換え微生物を植物組織あるいはカルスと共存培養等により感染させることによって、宿主植物に該 c DNA を導入することができる (文献: Komari, T. (1989) Plant Science, 60, 223; Visser, R.G. F. et al., (1989) Plant Molecular Biology 12, 329等)。なお、植物においてこれらの組換え DNA を有する個体を育成するには、公知の組織培養法により器官あるいは個体を再生させればよい。

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下

で発現させ、本来植物が有する P F K 活性を抑制できることである。

ここで、微生物としては大腸菌等のエスケリッチア属等の細菌やパン酵母等のサッカロミセス属等の酵母がある。また、植物としては主としてアグロバクテリウム属細菌-R i / T i プラスミド系による形質転換が可能な双子葉植物、例えばバレイショ、タバコ、トマト等に代表されるナス科植物、メロン、キュウリ等のウリ科植物、ダイコン、ナタネ等のアブラナ科植物、ブドウ、柑橘類等の果樹類が挙げられる。その他、P E G-リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルボンバードメント法等による形質転換が可能な植物としては、イネ、トウモロコシ等に代表されるイネ科植物等の単子葉植物がある。動物では、ヒト、マウス等の各種培養細胞 (BALB/c-3T3等) が挙げられる。これらの宿主に使用されるベクターを以下に例示する。

文献 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等) に記載の各種プラスミドベクター (pBR322、pUC 系プラスミド等) およびファージベクター ( $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11、 $\lambda$ ZAP 等) などがあり、酵母、動物細胞のベクターとしては、文献 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等) に記載の各種ベクターが挙げられる。植物のベクターとしては、通常クローニングに用いられるプラスミド由来の各種ベクターやバイナリーベクター (pGA482、pBin19等) などの T i プラスミド由来のベクター類が挙げられる (文献: An, G. et al (1986) Plant Physiol. 81, 301; Bevan, M., (1984) Nucleic Acids Research 12, 8711 等)。但し、T i プラスミド由来の植物ベクターの場合は、得られた組換えDNAを一旦アグロバクテリウム・ツムファシエンス等 (LBA4404 等) のアグロバクテリウム属の細菌に導入し、本組換え微生物を植物組織あるいはカルスと共存培養等により感染させることによって、宿主植物に該 c DNAを導入することができる (文献: Komari, T. (1989) Plant Science, 60, 223; Visser, R. G. F. et al., (1989) Plant Molecular Biology 12, 329等)。なお、植物においてこれらの組換えDNAを有する個体を育成するには、公知の組織培養法により器官あるいは個体を再生させればよい。

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下

で発現させ、本来植物が有する P F K 活性を抑制できることである。

ここで、微生物としては大腸菌等のエスケリッチア属等の細菌やパン酵母等のサッカロミセス属等の酵母がある。また、植物としては主としてアグロバクテリウム属細菌-R i / T i プラスミド系による形質転換が可能な双子葉植物、例えばバレイショ、タバコ、トマト等に代表されるナス科植物、メロン、キュウリ等のウリ科植物、ダイコン、ナタネ等のアブラナ科植物、ブドウ、柑橘類等の果樹類が挙げられる。その他、P E G-リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルボンバードメント法等による形質転換が可能な植物としては、イネ、トウモロコシ等に代表されるイネ科植物等の単子葉植物がある。動物では、ヒト、マウス等の各種培養細胞 (BALB/c-3T3等) が挙げられる。これらの宿主に使用されるベクターを以下に例示する。

文献 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等) に記載の各種プラスミドベクター (pBR322、pUC 系プラスミド等) およびファージベクター ( $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11、 $\lambda$ ZAP 等) などがあり、酵母、動物細胞のベクターとしては、文献 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等) に記載の各種ベクターが挙げられる。植物のベクターとしては、通常クローニングに用いられるプラスミド由来の各種ベクターやバイナリーベクター (pGA482、pBin19等) などの T i プラスミド由来のベクター類が挙げられる (文献: An, G. et al (1986) Plant Physiol. 81, 301; Bevan, M., (1984) Nucleic Acids Research 12, 8711 等)。但し、T i プラスミド由来の植物ベクターの場合は、得られた組換え DNA を一旦アグロバクテリウム・ツムファシエンス等 (LBA4404 等) のアグロバクテリウム属の細菌に導入し、本組換え微生物を植物組織あるいはカルスと共存培養等により感染させることによって、宿主植物に該 c DNA を導入することができる (文献: Komari, T. (1989) Plant Science, 60, 223; Visser, R.G. F. et al., (1989) Plant Molecular Biology 12, 329等)。なお、植物においてこれらの組換え DNA を有する個体を育成するには、公知の組織培養法により器官あるいは個体を再生させればよい。

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下

で発現させ、本来植物が有する P F K 活性を抑制できることである。

ここで、微生物としては大腸菌等のエスケリッチア属等の細菌やパン酵母等のサッカロミセス属等の酵母がある。また、植物としては主としてアグロバクテリウム属細菌-R i /T i プラスミド系による形質転換が可能な双子葉植物、例えばバレイショ、タバコ、トマト等に代表されるナス科植物、メロン、キュウリ等のウリ科植物、ダイコン、ナタネ等のアブラナ科植物、ブドウ、柑橘類等の果樹類が挙げられる。その他、P E G-リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルボンバードメント法等による形質転換が可能な植物としては、イネ、トウモロコシ等に代表されるイネ科植物等の単子葉植物がある。動物では、ヒト、マウス等の各種培養細胞 (BALB/c-3T3等) が挙げられる。これらの宿主に使用されるベクターを以下に例示する。

文献 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等) に記載の各種プラスミドベクター (pBR322、pUC 系プラスミド等) およびファージベクター ( $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11、 $\lambda$ ZAP 等) などがあり、酵母、動物細胞のベクターとしては、文献 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等) に記載の各種ベクターが挙げられる。植物のベクターとしては、通常クローニングに用いられるプラスミド由来の各種ベクターやバイナリーベクター (pGA482、pBin19等) などの T i プラスミド由来のベクター類が挙げられる (文献: An, G. et al (1986) Plant Physiol. 81, 301; Bevan, M., (1984) Nucleic Acids Research 12, 8711 等)。但し、T i プラスミド由来の植物ベクターの場合は、得られた組換え DNA を一旦アグロバクテリウム・ツムファシエンス等 (LBA4404 等) のアグロバクテリウム属の細菌に導入し、本組換え微生物を植物組織あるいはカルスと共存培養等により感染させることによって、宿主植物に該 c DNA を導入することができる (文献: Komari, T. (1989) Plant Science, 60, 223; Visser, R.G. F. et al., (1989) Plant Molecular Biology 12, 329等)。なお、植物においてこれらの組換え DNA を有する個体を育成するには、公知の組織培養法により器官あるいは個体を再生させればよい。

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下

で発現させ、本来植物が有する P F K 活性を抑制できることである。

ここで、微生物としては大腸菌等のエスケリッチア属等の細菌やパン酵母等のサッカロミセス属等の酵母がある。また、植物としては主としてアグロバクテリウム属細菌-R i / T i プラスミド系による形質転換が可能な双子葉植物、例えばバレイショ、タバコ、トマト等に代表されるナス科植物、メロン、キュウリ等のウリ科植物、ダイコン、ナタネ等のアブラナ科植物、ブドウ、柑橘類等の果樹類が挙げられる。その他、P E G-リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルボンバードメント法等による形質転換が可能な植物としては、イネ、トウモロコシ等に代表されるイネ科植物等の単子葉植物がある。動物では、ヒト、マウス等の各種培養細胞 (BALB/c-3T3等) が挙げられる。これらの宿主に使用されるベクターを以下に例示する。

文献 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等) に記載の各種プラスミドベクター (pBR322、pUC 系プラスミド等) およびファージベクター ( $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11、 $\lambda$ ZAP 等) などがあり、酵母、動物細胞のベクターとしては、文献 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等) に記載の各種ベクターが挙げられる。植物のベクターとしては、通常クローニングに用いられるプラスミド由来の各種ベクターやバイナリーベクター (pGA482、pBin19等) などの T i プラスミド由来のベクター類が挙げられる (文献: An, G. et al (1986) Plant Physiol. 81, 301; Bevan, M., (1984) Nucleic Acids Research 12, 8711 等)。但し、T i プラスミド由来の植物ベクターの場合は、得られた組換え D N A を一旦アグロバクテリウム・ツムファシエンス等 (LBA4404 等) のアグロバクテリウム属の細菌に導入し、本組換え微生物を植物組織あるいはカルスと共存培養等により感染させることによって、宿主植物に該 c D N A を導入することができる (文献: Komari, T. (1989) Plant Science, 60, 223; Visser, R.G. F. et al., (1989) Plant Molecular Biology 12, 329等)。なお、植物においてこれらの組換え D N A を有する個体を育成するには、公知の組織培養法により器官あるいは個体を再生させればよい。

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下

の鋳型として、2本鎖cDNAは下記のcDNAライブラリーの作成に使用した。cDNAの合成方法は、試薬あるいはキットに添付されている方法に従った。

#### 6: $\lambda$ gt10 cDNA ライブラリーの作成

品種Brodick 塊茎のポリ(A) + RNAからオリゴdT(12-18)をプライマーとして合成した、あるいはを品種Recordの塊茎芽生えのポリ(A) + RNAからランダムヘキサヌクレオチドをプライマーとして合成した2本鎖cDNAを使い $\lambda$ gt10 cDNA ライブラリーを作製した。 $\lambda$ gt10cDNAクローニングキット(Amersham)を使い、添付されているマニュアルに従ってライブラリーを作成した。但しキットに含まれるアダプターは用いず、Eco RI/Not Iアダプター(Pharmacia LKB)を使用した。

#### 7: 精製したPFKのN末端部分をコードするcDNAの単離

表1に示すアミノ酸配列をもとにDNA合成機で合成したN10、N20RI(表2)各500 pmolをプライマーとして、品種RecordのゲノムDNAあるいはBrodick 芽生えポリ(A) + RNA由来の一本鎖cDNA各々1.0、0.1  $\mu$ gを鋳型としてPCRを行った。緩衝液はTaqポリメラーゼ(Ampri Taq:Perkin-Elmer Cetus)に添付されているものをマニュアルに従って使用した。酵素は2.5 U、各ヌクレオチドは20 nmolずつ加え、総容量100  $\mu$ lで反応を行った。94 $^{\circ}$ C 1分、50 $^{\circ}$ C 2分、72 $^{\circ}$ C 2分の一連の反応を35回繰り返したのち72 $^{\circ}$ Cで10分反応させた。反応液の一部を取り、4%アガロースゲル電気泳動で解析したところ、いずれのDNAを鋳型にした場合も約60塩基対のPCR産物が検出された。これら約60塩基対のDNAをプラスミドベクター pCR1000 (Invitrogen)に添付されているマニュアルに従ってサブクローニングした。その結果、数多くの組換えプラスミドを有する大腸菌コロニーを得た。このうち、約60塩基対の挿入断片を持つ7クローン(Record cDNA 由来4クローン、Brodick ゲノムDNA由来3クローン)から常法に従ってプラスミドを回収した。これら7クローンが有するPCR産物の塩基配列をジデオキシチェーンターミネーション法で決定した。SEQUENASE Var2 (U.S. Biochemical Corp)を使い、添付されているマニュアルに従って塩基配列を決定した。1クロ



ーンを除き他の6クローン(Record cDNA 由来4クローン、Brodick ゲノム DNA由来2クローン)は共通のDNA 塩基配列(23塩基対)を有していた。この23塩基をDNA合成機で合成したものをPFK23(表3)と名付け、下記のPCRのプライマーとして、あるいはcDNAライブラリーのスクリーニングの際にプローブとして使用した。

表3 PFK23のDNA塩基配列(5' → 3')

---

ATGAAGGTGGTGAAAGGAGATTA

---

#### 8: 部分長PFK cDNAの単離

品種Record芽生えλgt10 cDNAライブラリー(15万 pfu)をプレートライセート法で増幅したのち精製したλDNA 1.0 μgを鋳型として、PFK23とλgt10のDNA塩基配列を持つλ1232(表4)各100 pmolをプライマーとしてPCRを行った。アニーリング温度が60℃である点を除き、反応条件は前出のPCRと同様である。その結果、約600塩基対のPCR産物が得られた。このPCR産物を前出のプラスミドベクター pCR1000にサブクロニングし、得られた組換えプラスミドの1つをpPFK01と命名した。プラスミドpPFK01に挿入されているPCR産物のDNA塩基配列を前出の方法に従って決定した。DNA塩基配列からアミノ酸配列を推定したところ、一部は既知のPFKのアミノ酸配列と有意な相同性を示した。また5'末端には上記の精製PFKから決定されたアミノ酸配列をコードするDNA塩基配列が存在した。

#### 9: 完全長PFK cDNAの単離

プラスミドpPFK01を制限酵素Not Iで切断して得られる約600塩基対のDNA断片を放射性同位元素<sup>32</sup>Pで標識し、これをプローブとして品種Brodick塊茎λgt10 cDNAライブラリー(約40万 pfu)をブランクハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした。その結果、57個の独立の陽性ブランクを得た。このうち24ブランクを無作為に選び、上記約600塩基対のDNA断片とPFK23をプローブとして2次スクリーニングを行った。その結果、11クローンが両標識プローブに対し陽性であった。更に三次スクリーニングの後、これ

ら独立の11クローンからプレートライセートを調製した。ライセート10 $\mu$ lを鋳型として、また表4に示した合成DNA $\lambda$ 1232および $\lambda$ 1231各50 pmolをプライマーとしてPCRを行った。アニーリング温度が60 $^{\circ}$ Cである点を除き、前出のPCRと同様に反応を行った。PCR産物を0.8%アガロースゲル電気泳動で解析した結果、 $\lambda$ DNAの部分を除いたcDNA断片のみの長さは約1700-2200塩基対と推定された。前出の約600塩基対のDNA断片を放射性同位元素 $^{32}$ Pで標識したプローブを使い、バレイショ塊茎ポリ(A)+RNAを常法に従ってノーザン解析したところ、PCRの結果とほぼ一致する約2000-2300塩基のポリ(A)+RNAが検出された。これらの11個の $\lambda$ gt10クローンから制限酵素Not Iで切出された挿入DNA断片部分をプラスミドベクター pBruescript SK II(-) (Stratagene) の制限酵素Not I 認識部位にサブクローニングした組換えプラスミドをpPFK16、17、19、26、28、29、31、32、33、34、35と命名した。

表4 PCRに用いた $\lambda$ gt10由来のプライマーのDNA塩基配列 (5'→3')

---

$\lambda$ 1 2 3 2 :	CTTATGAGTATTTCTCCAGGGTA
$\lambda$ 1 2 3 1 :	AGCAAGTTCAGCCTCGTTAAG

---

pPFK32のcDNA挿入断片については全DNA塩基配列1978塩基対を前出の方法に従って決定し、アミノ酸配列と共に配列表の配列番号1に示した。決定した精製PFKのN末端アミノ酸配列(配列表の配列番号1中の第3番目のスレオニンから第26番目のロイシンまで(もっとも、精製PFKの第24、25番目のアミノ酸は表1に示すように決定できなかった))を含む485アミノ酸に翻訳される1455塩基対からなる領域を有していた。推定アミノ酸配列から、精製バレイショ塊茎PFKポリペプチドのN末端よりも2アミノ酸上流に開始コドンにコードされるメチオニンがあった。推定分子量は53.8キロダルトンで、Kruger等 (Arch. Biochem. Biophys. 267, 690-700. 1988) が推定したバレイショ塊茎PFK-dポリペプチドの分子量53キロダルトンとほぼ一致した。133-135番目のATGがPFKの開始コドンである理由は、まず、このATGの

前にフレームの異なる終止コドン（例えばTGA: 15-17番目、TAA: 26-28番目、TGA: 55-57番目）が存在し、単離したcDNAの1番目の塩基C以前にATGがたとえ存在してもそれはPFKの開始コドンとはならないからである。また、36-38番目にATGが存在するが、90-92番目に終止コドン（TGA）が同じフレームで存在し、このATGはPFKの開始コドンにはならない。

#### 《単離したcDNAにコードされるPFKの特性》

##### 10: 植物PFK遺伝子の大腸菌での発現

単離した遺伝子がまちがいなく酵素活性を持つPFKをコードする遺伝子であることを証明するためには、その遺伝子を実際に発現させる必要がある。そこで、単離した遺伝子を下記のように大腸菌に導入してその発現を試みた。

まず、プラスミドpPFK32 250 ngを鋳型として、制限酵素Eco RI、Pst I 認識部位をそれぞれ導入したPFK32とPFK32R（表5）各30 pgをプライマーとしてPCRを行った。アニーリング温度が30、35あるいは40℃であること、反応回数が5回であること、DNAポリメラーゼとしてpfu DNAポリメラーゼ（Stratagene）を使用したことを除き、前出の方法と同様に反応を行った。PCR産物を0.8%アガロースゲル電気泳動で分画後、目的の約1800塩基対のバンドを切り出し、常法に従ってDNAをゲルの中から回収した。この約1800塩基対のDNAを制限酵素Eco RI、Pst I で切断後、制限酵素Eco RI、Pst I で切断した大腸菌発現プラスミドベクター pKK223-2（Pharmacia LKB）に組込んだ。この組換えプラスミド（pKK32）を常法に従って大腸菌XL1-Blue（Biotechniques, 5, 4. 376-378, 1987）に導入後、抗生物質カーベニシリン（50  $\mu$ g/ml）を含むLuria-Bertani（以下LBと称する）寒天培地上、37°Cで一晩培養した。出現した多数のコロニーの中から110個を選び、プラスミドpPFK32から制限酵素Not I で切り出される約2000塩基対のDNA断片を放射性同位元素<sup>32</sup>Pで標識し、これをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行った結果、66個の陽性コロニーを得た。これらバレイショPFK遺伝子の導入が確認された大腸菌は、微生物PFKとは活性制御の受け方の異なるPFKが発現して代謝を乱すためか、イソ

プロピル $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド（以下IPTGと称する）1 mMを含むLB寒天培地上ではほとんど生育できなかった。そこで、以下のように大腸菌に導入したPFK遺伝子を発現させた。まず、カーベニシリン（50  $\mu$ g/ml）を含むLB液体培地中で600nm 吸光値が0.3-0.7になるまで37°Cで振盪培養した。次にIPTG（1 mM）を加え、一定時間振盪培養後菌体を回収し、Tabita等の方法（Anal. Biochem. 84, 462-472, 1978）に従いトルエンで溶菌後、PFK活性をKruger等の方法（Arch. Biochem. Biophys. 267, 690-700, 1988）に従い測定した。大腸菌No. 58株は、コントロールの大腸菌No. 1株（pKK223-2を導入）に比べ約7倍高いPFK活性を示した（図1）。

表5 制限酵素Eco R1、Pst 1 認識部位を導入したPCRプライマーのDNA塩基配列（5'  $\rightarrow$  3'）

---

\*\*\*\*\*

PFK 3 2 : TATATATTTGGAATTCATGGGTACTGAG

Eco R1

\* \*

PFK 3 2 R : CAAAAGACCCTGCAGCCACACAG

Pst 1

\*:ミスマッチ部位

---

次に、大腸菌No. 58株の持つ高PFK活性が植物PFKに由来するのか、それとも大腸菌XL1-BlueのPFK活性に由来するのかを調べるため、免疫滴定実験をKruger等の方法（Arch. Biochem. Biophys. 267, 690-700, 1988）に従って行った。

免疫滴定実験の結果、大腸菌No. 58株の持つ高PFK活性は抗大腸菌PFK抗体ではほとんど除去されなかったが、抗バレイショPFK-c抗体（オックスフォード大学植物科学部Kruger博士から譲渡）では有意に除去された（図2）。この抗バレイショPFK-c抗体は、バレイショPFK-cおよびPFK-dと強く反応し、大腸菌PFKとはほとんど反応しないことがウェスタンブロ

ット解析、あるいは免疫滴定実験により確認されている。

以上の結果から、大腸菌No. 58株でIPTG誘導発現した蛋白質は間違いなくバレイショPFKであると同定され、プラスミドpPFK32に挿入されているcDNAはバレイショPFK遺伝子と同定された。

#### 11: バレイショPFKと他生物PFKのアミノ酸配列の比較

pPFK32の有するバレイショPFKをコードするcDNAの塩基配列から推定したアミノ酸配列をデータベース (The Swiss Prot data bank (Release 23))

検索により既知のPFKアミノ酸配列と比較した。報告のあるPFKと数十%以下の相同性しか示さなかったが、相同部位はPFKを特徴付ける基質、補酵素、制御物質の結合部位 (Evans, P.R and Hudson, P.J. (1979) Nature., 279, 500-504) とその周辺部に集中していた。有意な相同性を示した領域はアミノ酸番号でおよそ98-321であり、アミノ酸番号1-97、322-485のN末端、C末端領域では、報告のある他生物PFKと有意な相同性はほとんど見い出せなかった。報告のある真核生物PFKはF6Pが結合する触媒部位と、それとアミノ酸配列が良く似ているフルクローズ-2,6-二リン酸が結合する制御部位の2つが1本のポリペプチド鎖上にあるデュプリケート構造を有している。今回単離した植物PFK遺伝子の塩基配列から決定されたアミノ酸配列はそのような構造を持たないことが明らかになった。また、他生物PFKに共通して保存されているアミノ酸であるにもかかわらずバレイショPFKでは保存されていないアミノ酸がF6Pの推定結合部位のいくつかを含めて数十個も存在した。以上のことは、植物PFKが今まで報告のあるPFKとは異なる構造、機能を持つことを示唆している。

また、植物には、プラスチド型と細胞質型の2種類のPFKがあると言われている。本発明のバレイショPFKcDNAにコードされるPFKは、精製タンパク質に比べ2アミノ酸 (Met、Gly) 長いN末端を有しているが、この相違が精製によって生じた切断によるものか細胞内で生じた切断によるものか不明である。しかし、アミロプラストや葉緑体といったプラスチドへのポリペプチドの輸送に関与するトランジットペプチドを持たず、細胞質型PFKをコードしていることが明らかになった。

## 12: 大腸菌で発現したバレイシヨ由来PFKの精製

バレイシヨPFKの発現が確認された大腸菌No. 58株からバレイシヨPFKを以下のように精製し、低温下での安定性について調査した。約0.3gの菌体を抽出用緩衝液(100mM Tris-HCl(pH8.0), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 14mM 2-メルカプトエタノール、1mM PMSF, 1 $\mu$ M ロイペプチン、1 $\mu$ M ペプスタチン)に懸濁後、超音波破碎し、50,000xgで30分間遠心後、上清を回収した。次に、抽出用緩衝液にグリセロールを10%(v/v)添加した緩衝液Aで平衡化したシバクロンブルーアガロース(type3000-CL, Sigma)カラム(16X55mm)に上清を掛けた。この操作により大部分の大腸菌PFKはゲルに強く吸着し、バレイシヨPFKの大部分は、吸着せずフロースルーとして回収された。次に、回収液を緩衝液Aで平衡化したリアクティブレッド120-アガロース(type3000-CL, Sigma)カラム(16X110mm)に掛けてPFKを吸着させた。25mlの緩衝液Aで洗浄後、0-1.0MKCl直線濃度勾配をつけた緩衝液A150mlを使いPFKを溶出した。PFK活性を含む画分を集め、限外濾過(AmiconPM10膜)により3mlに濃縮後、緩衝液Aで平衡化したバイオゲルP-6カラム(Bio-Rad)で脱塩した。最後に、脱塩した試料を緩衝液Aで平衡化したモノQカラム(0.5X50mm, Pharmacia LKB)に掛けた。5mlの緩衝液Aで洗浄後、0-1.5MKCl直線濃度勾配をつけた緩衝液A150mlを使いPFKを溶出した。PFK活性を含む画分を集め精製標品とした。精製標品を尿素/SDS-PAGEで分画後、ゲルをCBB染色、あるいはニトロセルロースフィルターにポリペプチドを転写し、抗バレイシヨPFK-c抗体を使ったウェスタンブロット解析を行った結果、両者とも53キロダルトンのポリペプチドを検出した(図3)。この結果、単離したPFK遺伝子はPFK-dをコードすることが判明した。

## 13: 大腸菌で発現したバレイシヨPFKの低温耐性の確認

この精製したPFKを使用し酵素活性の低温安定性を0~25℃の温度範囲でHammond等の方法(Planta 180, 613-616, 1988)に従って調査した。低温下での酵素の安定性を示す指標としてQ10値を使用した。X軸に温度、Y軸に酵素活性の対数を取ったグラフのある温度での傾きをdy/dxとすると、dy/dx

= 0. 11 log Q 10 で表される。大腸菌で発現させたバレイシヨ品種Brodict由来のPFKは0℃の低温下でQ 10 値が2. 42 という低い値を示し、25℃の室温下のQ 10 値1. 66 に比べてもさほど変化しなかった(表6)。プラスミドpPFK32に挿入されているcDNAがコードするPFKの5℃でのQ 10 値は2. 24であったが、この値を他の報告されているPFKのQ 10 値と比較してみると、大腸菌PFK-1では5℃でのQ 10 値が2. 89 (Kruger, N.J.(1989)Biochemical Society Transaction 629th Meeting, London Vol. 17 760-761)、低温低糖性を有さないバレイシヨ品種Recordの塊茎PFKでは、2-6℃でのQ 10 値が3. 10 (PFKIII) および4. 20 (PFKIV) (Hammond, J.B.W. et al. Planta (1990)180, 613-616)であり、本発明で単離したバレイシヨPFK遺伝子にコードされるPFKが、大腸菌PFKや低温低糖性を有さないバレイシヨ品種のPFKに比べ有意に低温耐性を有していることが証明された。またPFKと基質F6Pを巡って競合関係にあるスクロース合成系の律速酵素SPSのQ 10 値は、2-10℃で2. 25とap Rees 等が報告しているが(Plants and Temperature (ed. Long, S.P. and Woodward, F.I.) Society of Experimental Biology Seminar Series No. 42. Cambridge, UK; Cambridge University Press. pp. 377-393)、本発明のPFKはSPSと同レベルの低温耐性を有している(表6)。よって本発明のPFK遺伝子を、低温貯蔵中の塊茎で強く発現するプロモーターの支配下で発現させることにより、低温貯蔵塊茎中のスクロース含量の低いバレイシヨ品種を開発することができ、その結果、低温低糖性(グルコース、フルクトース含量の低い)バレイシヨ品種を作出できる。

表6 大腸菌で発現させたバレイシヨPFKのQ 10 値

温度(℃)	0	1	2	5	7	10	15	20	25
Q 10 値	2.42	2.38	2.35	2.24	2.18	2.10	1.93	1.79	1.66

単離したバレイショ P F K c D N A をプローブとして、種々植物 P F K 遺伝子の単離を試みた。イネ（品種月の光）未熟胚由来カルス、トウモロコシ胚乳由来カルス、フラベリア緑葉、ラディッシュ緑葉から前述のバレイショと同様の方法で m R N A を単離し、以下の方法で c D N A ライブラリーを作成した。イネ、フラベリア、ラディッシュ c D N A ライブラリーは、TimeSaver cDNA Synthesis Kit(Pharmasia)、λ ZAP II Cloning kit(Stratagene)、Gigapack II Gold(Stratagene) を使用し、添付されているマニュアルに従って作成した。トウモロコシ c D N A ライブラリーは、cDNA Synthesis Kit(Amersham)、λgt10 cDNA cloning kit(Amersham) を用いて、キットに添付されているマニュアルに従って作成した。

作成した c D N A ライブラリーから、P F K c D N A が組み込まれたラムダファージをプラークハイブリダイゼーション法によって単離した。その際、前出のプラスミド pPFK32 から制限酵素 Not I を用いて切り出される約 2 キロ塩基対の D N A 断片を放射性同位元素  $^{32}\text{P}$  で標識しプローブとして使用した。その結果、作成した全ての c D N A ライブラリーから本プローブと反応する陽性プラークを得ることができた。トウモロコシ P F K c D N A は、プレートライセート法を使って精製した λ D N A を制限酵素 EcoR I で消化し、P F K c D N A を含むインサート部分をプラスミド pBluescript SK II (-)(Stratagene) にサブクロニング後、前出のバレイショ P F K と同様の方法で D N A 塩基配列を決定した。その他の植物 P F K c D N A は、λ ZAP II Cloning kit(Stratagene) に含まれるヘルパーファージ (ExAssist helper phage(M13)) と大腸菌 (SOLR strain) を使い、添付されているマニュアルに従ってプラスミド pBluescript SK(-)(Stratagene) にサブクロニング後、前出のバレイショ P F K と同様の方法で D N A 塩基配列を決定した。フラベリア、イネ、トウモロコシ、ラディッシュ P F K の D N A 塩基配列を各々配列表の配列番号 3、5、7、9 に示し、D N A 塩基配列から推定されるアミノ酸配列を各々配列表の配列番号 4、6、8、10 に示した。いずれの植物 P F K アミノ酸配列もバレイショ P F K - d アミノ酸配列（配列表の配列番号 2）と非常に高い相同性を示したが、報告されている細菌、ほ乳類、酵母等の他生物 P F K 塩基配列との相同性はそれに比べ有意に低かった。今回バレイシ



ヨ P F K 遺伝子をプローブに使用して P F K が単離された植物は、単子葉植物（イネ、トウモロコシ）、双子葉植物（フラベリア、ラディッシュ）の両者を含み、植物種では、イネ科（イネ、トウモロコシ）、キク科（フラベリア）、十字花科（ラディッシュ）と広範囲に渡り、配列表の配列番号 1 に示したバレイシヨ P F K c D N A は種々植物 P F K 遺伝子の単離に広く利用できることが証明された。

また種々植物 P F K のアミノ酸配列を比較した結果、種々植物に共通して存在するアミノ酸配列（5 アミノ酸以上）が 13箇所見つかった（表 7）。この中には、報告のある他生物 P F K には存在しない植物特異的なアミノ酸配列が含まれている（配列表の配列番号 11、14、21、22）。特に、配列表の配列番号 22 に示したアミノ酸配列は、この配列が P F K ポリペプチド上に存在する位置から判断して、細菌 P F K で報告されている基質 F 6 P の結合部位およびその近傍のアミノ酸配列（Leu Gly His Val Gln Arg Gly Gly 付近）に相当すると考えられる（Evans, P. R. and Hudson, P. J. (1979) Nature., 279, 500-504）。この基質結合部位およびその近傍のアミノ酸配列は、他生物間では非常に良く保存されているが（Heinisch, J. et al., (1989) Gene., 78, 309-321）、植物ではこのアミノ酸配列は全く存在せず、そのかわり配列番号 22 に示した別のアミノ酸配列が共通配列として存在することが明らかになった。

以上のように、配列表の配列番号 1 に示したバレイシヨ P F K c D N A は、種々植物 P F K 遺伝子の単離にプローブとして利用可能であることが証明された。また、種々植物 P F K アミノ酸配列の比較から、植物 P F K に共通して存在すると考えられるアミノ酸配列（表 7）が同定され、例えば、P C R 法を利用して植物から P F K 遺伝子を単離する際に D N A プライマー合成の参考になるアミノ酸配列が本発明によって供給された。さらに、他生物 P F K には存在することが報告されていないが植物 P F K には共通して存在すると考えられるアミノ酸配列が同定された。つまり、本発明によって植物 P F K を特徴づけるアミノ酸配列（配列表の配列番号 11、14、21、22）が初めて同定された。

表7 種々植物P F Kに共通のアミノ酸配列  
(番号は配列番号1中のアミノ酸番号に対応)

---

(1) Arg Ala Gly Pro Arg		
	80	
(2) Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Leu Asn		
	100	105
(3) Gly Tyr Arg Gly Phe		
	135	
(4) Ile Val Asp Ser Ile Gln		
	175	
(5) Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Ile		
	220	
(6) Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu		
	230	235
(7) Ala Gln Arg Ala Ile Asn		
	240	
(8) Val Lys Leu Met Gly Arg		
	260	265
(9) Ser Gly Phe Ile Ala		
	270	
(10) Ala Glu Gly Ala Gly Gln		
	320	
(11) Asp Ala Ser Gly Asn		
	340	
(12) Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met		
	370	375
(13) Cys Leu Ile Pro Glu		
	285	

### 15 : 植物形質転換用プラスミドベクターの構築

バレイショ品種Brodick の低温耐性遺伝子を植物に導入するために、図4に示したプラスミドpPFK(35S)を作成した。以下にプラスミドpPFK(35S)の詳しい作成方法を述べる。まず、制限酵素HindⅢ、Not I、Bgl Ⅱ、BamH I、EcoR I、Sma I、Pst I、Sst I、Bcl I、Bgl Ⅱ、Not I、EcoR Iの認識配列をこの順番に含むポリリンカー (Agricultural Genetics Company, Cambridge, United Kingdomより入手) を制限酵素HindⅢ、EcoR Iで消化したプラスミドpUC19 に連結し、これをpUC19(PL) と命名した。次に、プラスミドpAPT9 (Agricultural Genetics Company, Cambridge, United Kingdomより入手) から制限酵素Sst I、BamH Iによって切り出されるノパリン合成酵素遺伝子のポリアデニレーションシグナル配列 (約0.3キロ塩基対) を制限酵素Sst I、Bcl Iで消化したpUC19 (PL) に連結し、これをpUC19(nos term) と命名した。次に、パタチン (patatin) プロモーター配列部分をプラスミドpBI240.7 (Bevan et al., Nucleic Acid research 14:4625-4638, 1986) から制限酵素Bgl Ⅱ、BamH Iを使って約2.3キロ塩基対の断片として切り出し、制限酵素Bgl Ⅱ、BamH Iで消化したpUC19(nos term) に連結し、これをpUC19(pat/nos term) と命名した。次に、前述のプラスミドpKK32 から制限酵素EcoR I、Pst Iを使って低温耐性P F K遺伝子 (約1.8キロ塩基対) を切り出し、制限酵素EcoR I、Pst Iで消化したpUC19(pat/nos term) に連結し、それをpPFK(pat) と命名した。次に、プラスミドpPFK(pat) を制限酵素EcoR Iで消化後、大腸菌DNAポリラーゼIのクレノウ断片(Klenow fragment) で平滑末端化した。最後に、この平滑末端化したプラスミドを制限酵素Sst Iで消化し、切り出された約1.8キロ塩基対の低温耐性P F K遺伝子を、制限酵素Sma I、Sst Iで消化したプラスミドpROK2(pBin19由来: Baulcombe, D. et al., (1986) Nature., 321, 446-449) に連結し、これをpPFK(35S) と命名した (図4)。

### 16 : バレイショの形質転換

シェンとフォードが報告したエレクトロポレーション法 (Shen, W-J and Forde, B.G (1989) Nucleic Acid Research 17, 8385) を利用して、

Agrobacterium tumefaciens LBA4404 に図 4 に示したベクタープラスミド pPFK (35S) を導入し、その菌株を LBA4404(35S/PFKd) と命名した。次に LBA4404(35S/PFKd) を用いて植物の 1 例としてバレイシヨ品種 Bintje の形質転換を試みた。以下に形質転換法について詳しく述べる。まず、バレイシヨ品種 Bintje のウィルスフリー無菌植物体はスコテッシュアグリカルチュラルサービスエージェンシー (Scottish Agricultural Services Agency, Edinburgh, United Kingdom) より購入した。購入したインビトロ植物体から複数の単節を無菌的に切り出し、各節をリンスマイヤーとスクーグの培地 (以下 L S 培地と称する) (Linsmaier, E. and Skoog, F. (1965) *Physiol. Plant.*, 18, 100-127) の無機塩、スクロース 30 g/L、寒天 8 g/L を含む固形培地に置床し培養することによって無菌植物体を増殖した。この増殖した植物体の茎あるいは葉を以下の形質転換に利用した。無菌的に切り出した茎 (長さが約 0.5 - 2.0 cm) あるいは葉 (縦が約 0.6 - 1.0 cm、横が約 0.5 - 1.0 cm の大きさ) は、L S 培地の無機塩、30 g/L のグルコースを含む液体培地中で LBA4404(35S/PFKd) と 25℃ で 48 時間共存培養した。共存培養開始時の LBA4404(35S/PFKd) の濃度は約 10<sup>8</sup> 細胞/mL に調整した。共存培養終了後、茎あるいは葉の切片を抗生物質セフトキシム (cefotaxim) を 250 mg/L 含む滅菌水で数回洗浄した。洗浄後、笠岡らが報告した K S 1 培地 (特開平 6-133783) に茎あるいは葉の切片を置床した。置床後約 20 日で抗生物質カナマイシン (kanamycin) 抵抗性カルスが出現し、更に 10 - 30 日培養を続けるとカルスから植物体が再分化した。このカナマイシン抵抗性を示す植物体を単節毎に切断し、各々を L S 培地の無機塩、スクロース 30 g/L、セフトキシム 250 mg/L、カナマイシン 100 mg/L、寒天 8 g/L を含む固形培地に置床し培養することによってカナマイシン抵抗性植物体を増殖した。増殖した植物体は、ポットに移植後、温室で栽培した。コントロールには、非形質転換体の品種 Bintje を用いた。コントロール植物体は、形質転換体と同様に試験管内で無菌的に増殖後、温室でポット栽培した。形質転換植物体およびコントロールの非形質転換植物体は、ポットに移植してから約 4 ヶ月後、植物体が完全に自然枯死した時点で塊茎を収穫した。収穫した塊茎は、低温貯蔵庫 (庫内温度 5.5 - 8.5℃ あるいは 15℃) に貯蔵

した。この塊茎を以下の種々の解析に供試した。

#### 17: 形質転換体バレイショにおける低温耐性PFKの発現

非形質転換体系統B40とカナマイシン抵抗性を有する形質転換体系統B75の茎葉からCTAB法(Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987) *Phytochemical Bulletin.*, 19, 11-15)によりDNAを抽出し、Sambrook等の方法(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に従ってサザン解析を行った。具体的には、DNAを制限酵素EcoRIで消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、DNAをナイロン膜に転写後、放射性同位元素<sup>32</sup>Pで標識したDNAプローブと反応させた。プローブとして、nos terminator領域(280塩基対)あるいは前出のプラスミドpKK32を制限酵素Bgl IとPst Iで消化することによって切り出される低温耐性PFK DNAの3' 非翻訳領域(235塩基対)を用いた。いずれのDNA断片をプローブとして用いた場合も系統B75ではテトラブroid当たり5コピーの遺伝子が導入されていることが確認された(データは示していない)。

次に温室でポット栽培した系統40あるいは系統B75から収穫した塊茎(15℃で2ヶ月貯蔵)からRNAを精製し、Sambrook等の方法(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に従ってノーザン解析を行った。試料として全RNA 30 μgを用いた。プローブとして、前出のプラスミドpKK32を制限酵素Bgl IとPst Iで消化することによって切り出される低温耐性PFK DNAの3' 非翻訳領域(235塩基対)を放射性同位元素<sup>32</sup>Pで標識したDNAを用いた。その結果を図5に示した。系統B75の塊茎では非常に強いシグナルが検出されたが、非形質転換体系統B40では、全くPFKポリ(A)+RNAは検出されなかった。本発明者の経験から、バレイショ塊茎中のPFKポリ(A)+RNAをノーザン解析によって検出する場合、全RNAではなく、さらに精製されたポリ(A)+RNAを試料として使用しなければ検出が困難なことが判明している。このことから判断して、系統B75の塊茎中では通常のバレイショでは考えられないほど大量のPFKポリ(A)+RNAが発現しており、この過剰の

P F K ポリ (A) + R N A は導入された低温耐性 P F K 遺伝子の転写産物と考えられた。

次に、収穫後 15℃で 2 ヶ月貯蔵した系統 B 7 5 と B 4 0 の塊茎から Kruger 等の方法 (Kruger, N. J. et al., (1989) Arch. Biochem. Biophys., 267, 690-700) に従って粗抽出液を調製し、ウェスタン解析を行った。抗体は、前出の抗バレイショ P F K - c 抗体を用いた。その結果を図 6 に示したが、使用した抗体と非特異的あるいは特異的に反応し検出されたポリペプチドの中で、系統 B 7 5 と系統 B 4 0 で違いが見られたのはこの P F K - d のみであった。系統 B 7 5 の塊茎ではコントロール系統 B 4 0 の塊茎に比べ約 3 - 4 倍多い P F K - d ポリペプチドが発現していることが判明した。この結果は、前出のノーザン解析の結果を裏付けるものであるが、系統 B 7 5 では、P F K ポリ (A) + m R N A の発現量に比べ P F K - d ポリペプチドの発現量は低かった。これは外来 P F K 遺伝子のポリ (A) + m R N A への転写量とそのタンパク質への翻訳量の比が、バレイショ塊茎が本来有する P F K 遺伝子のポリ (A) + m R N A への転写量とそのタンパク質への翻訳量の比に必ずしも一致しないことに起因するものと考えられる。

次に系統 B 7 5 と B 4 0 の塊茎 (収穫後 15℃で 2 ヶ月貯蔵) から Kruger 等の方法 (Kruger, N. J. et al., (1989) Arch. Biochem. Biophys., 267, 690-700) に従って粗抽出液を調製し、P F K 活性を測定した。1 回の測定に塊茎 1 個を使用し、3 回の測定値の平均値を表 8 に示した。その結果、系統 B 7 5 は系統 B 4 0 の約 1.3 倍高い全 P F K 活性を有していることが確認された。全 P F K 活性とは、Kruger 等 (Kruger, N. J. et al., (1989) Arch. Biochem. Biophys., 267, 690-700) が報告した P F K - a、- b、- c、- d の 4 種のポリペプチドの種々の組合せによって構成される P F K I、II、III、IV の活性の合計である。前出の大腸菌での発現実験で、P F K - d ポリペプチドのみで活性のある酵素を構築できることが証明されたが、系統 B 7 5 の塊茎で観察された P F K 活性上昇は、導入された P F K - d 遺伝子の過剰発現によってのみもたらされたと考えると、全 P F K 活性が約 1.3 倍の増加したという結果は、前出のウェスタン解析の結果 (P F K - d が 3 - 4 倍に増加) と矛盾しない。

次に系統 B 7 5 の塊茎 (収穫後 15℃で 2 ヶ月貯蔵) から粗抽出液を調製後、

レッドアガロース、モノQカラムを用いてPFK-dを含むPFKIVを部分精製し、種々の低温下でPFK活性を測定した。以下に具体的方法を説明する。まず、約20gの塊茎を約2-5mmの厚さにスライスし液体窒素中で凍結させ、マイナス70℃の低温下で保存した試料を酵素精製に用いた。以下全ての精製操作は4℃で行った。凍結試料は、40mLの抽出緩衝液（前出の緩衝液Aに2mM benzamidine, 1mM PMSF, 1  $\mu$ M leupeptin, 1  $\mu$ M pepstatin, 1%(W/V) insoluble polyvinylpyrrolidoneを添加したもの）を加え、乳棒と乳鉢で充分摩砕した。摩砕液をミラクロスで濾過後、濾液を20,000gで30分間遠心し、上清を回収した。上清をフィルター（0.45  $\mu$ m）で濾過後、緩衝液Aで平衡化したリアクティブレッド120アガロース（Type 3000-CL, Sigma）カラム（16X110mm）に掛けてPFKを吸着させた。以後の精製操作は、前出の大腸菌で発現させたPFKの精製操作に従った。モノQカラムクロマトグラフィーによってPFKは4つのピークに分離し、その中のPFKIVに相当する画分を回収し種々の温度でPFK活性を測定しQ10値を求めた。その結果を表9に示したが、部分精製されたPFKIVは低温下においても全く安定であり、そのQ10値は0℃から25℃のいずれの温度においても1.9-2.0であった。表6に大腸菌No. 58株から精製したPFKのQ10値を示したが、その結果と表9の結果を比較すると、両者には同一遺伝子が導入されているが、系統B75のPFKIVは大腸菌No. 58株で発現したPFKに比べ低温に対しより安定であった。また、系統B75に導入されたPFK遺伝子は元々バレイショ品種Brodickから単離された遺伝子であるが、Hammond等（Hammond, J.B.W. et al., (1990) *Planta.*, 180, 613-616）が報告したバレイショ品種BrodickのPFKIVよりも低温に対し安定であった。ウエスタン解析の結果から判断して系統B75で発現しているPFK-dポリペプチドの2/3から3/4は導入遺伝子の発現に由来すること、またKruger等（Kruger, N.J. et al., (1989) *Arch. Biochem. Biophys.*, 267, 690-700）が報告しているようにPFKIVがPFK-dポリペプチドを主要に含むことから判断して、B75のPFKIVで確認された低温耐性は導入遺伝子の効果である。

以上のように、図4に示したベクタープラスミドを用いて、大腸菌で低温耐性

P F Kとして発現することが確認された遺伝子のバレイショへの導入を試みた結果、系統B 7 5で導入遺伝子の発現が確認され、且つ系統B 7 5のP F K IVが低温耐性を有することが確認された。

表8 系統B 7 5の塊茎中の全P F K活性

系統	PFK 活性(nmol/min/g FW)
B40(コントロール)	108.4
B75	141.4

表9 系統B 7 5の塊茎から部分精製したP F K IVのQ 1 0 値

温度 (°C)	2	5	7	10	15	20	25
Q 1 0 値	1.91	1.92	1.92	1.93	1.94	1.95	1.96

1 8 : 低温耐性P F K遺伝子を導入したバレイショ塊茎の低温貯蔵下での糖含量の変化およびそれを材料として調製したポテトチップの色の变化

低温貯蔵 (5. 5 - 8. 5 °C) した系統B 7 5とB 4 0の塊茎の糖含量とポテトチップ色を調査した。その結果を表1 0に示した。糖としてグルコース含量を市販の尿糖試験紙 (商品名: テステープ、塩野義製薬株式会社製) を用いて測定した。具体的には、塊茎1個当たり1箇所塊茎表面にスパチュラを強く押し当てて深さ約5 mmの溝を切り込み、そこに尿糖試験紙を差し込み、グルコース含量を測定した。グルコース含量は、変化した試験紙の色を試験紙の容器に添付されているカラースケールと対比させ、以下に説明したスコアで表示した。容器のスコア0、+、++、+++、++++は、それぞれグルコース含量約0%、0. 1%、0. 25%、0. 5%、2%以上に相当する。表1 0に示した値は、カラースケールのスコア0、+、++、+++、++++を便宜上それぞれ0、1、



0、2. 0、3. 0、4. 0とした場合の値として表示している。表10に示した値は、5個の塊茎の測定値の平均値である。この値は、低いほどグルコース含量が低いことを意味している。その結果、系統B75では低温貯蔵4週間後の塊茎において、系統B40に比べグルコース含量が低いことが判明した。

一般に塊茎のグルコース含量とポテトチップ色の間には非常に高い相関関係があることが知られている (Gray, D and Hughes, J. C. (1978) *The Potato Crop* (ed. P. M. Harris), Capmann & Hall, London, pp. 504-544)。そこで、実際に系統B75、B40の低温貯蔵(2週間、4週間、12週間)塊茎を材料にしてポテトチップを調製し、褐変度を比較した。具体的には、塊茎を市販のスライサーで薄切りにし、これを180℃に熱した市販の食用油(なたね油と大豆油の混合油)の中で通常約3分から4分、気泡が出なくなるまで揚げてポテトチップを調製した。ポテトチップは、1系統1試験当たり5個の塊茎から3枚ずつ、合計15枚調製し、それぞれを肉眼によってポテトチップ用カラーカード(The Institute for Storage and Processing of Agricultural Produce, Wageningen, The Netherlands 作成)と対比させ、カラーカードに書かれているスコアで褐変度を表示した。このスコアは、値が高いほどポテトチップの褐変度が低いことを意味している。結果を表10に示したが、各スコアはポテトチップ15枚の平均値である。系統B75では、低温貯蔵2週間、4週間、12週間後のいずれの塊茎を供試しても系統40に比べ褐変度の低いポテトチップが調製された。

以上のように、図4に示したベクタープラスミドを用いてバレイショを形質転換し、低温耐性PFKを塊茎中で発現させることにより、低温貯蔵塊茎中のグルコースを減少させ、その結果ポテトチップの褐変を軽減できることが証明された。

表 1 0

低温耐性 P F K を発現させた系統 B 7 5 のグルコース含量とポテトチップ色

	グルコース 含量(カーブスア)		ポテトチップ 色(カーカードスア)			
	0	4 (週間貯蔵後)	0	2	4	12 (週間貯蔵後)
B40(control)	1.0	2.6	7.0	4.0	2.6	2.3
B75	1.0	1.2	7.0	5.5	3.7	3.5

## 配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 1978

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

## 起源

生物名 : ソラナムチュベローサム (Solanum tuberosum L.)

品種名 : ブロディック (Brodick)

組織の種類 : 塊茎

## 直接の起源

ライブラリー名 : 低温貯蔵塊茎 mRNA 由来  $\lambda$ gt10 cDNA ライブラリー

クローン名 : pPFK32

## 配列

```

CTCTTTTCTT GGGTTGACTC AAATTTAACA TATATATGTA TTTTTTTGTT TTTGTGATTC   60
TGTTTTTCAGA TACCCTTTTG AATTTCCATT GAGAAAGTTG GAATCTTTTT TGTTTTTATA  120
TATTTGGGGA AG ATG GGT ACT GAG AGT AAT TAC CAG ATG AAG GTG GTG AAA  171

      Met Gly Thr Glu Ser Asn Tyr Gln Met Lys Val Val Lys
           1             5             10

GGA GAT TAT GGC TAT GTT CTT GAA GAT GTT CCT CAT TTG ACT GAT TAT   219
Gly Asp Tyr Gly Tyr Val Leu Glu Asp Val Pro His Leu Thr Asp Tyr
      15             20             25

ATC CCT GAT CTT CCT ACT TAT GAC AAT CCA TTG CGG TCC AAT CCT GCA   267
Ile Pro Asp Leu Pro Thr Tyr Asp Asn Pro Leu Arg Ser Asn Pro Ala
      30             35             40             45

TAT TCA GTT GTG AAG CAG TAC TTT GTT GAC ATG GAT GAT ACT GTC CCC   315
Tyr Ser Val Val Lys Gln Tyr Phe Val Asp Met Asp Asp Thr Val Pro
           50             55             60

```

CAA AAG GTT GTT GTT CAC AAG GAC AGT CCC AGA GGG GTG CAT TTC CGG	363
Gln Lys Val Val Val His Lys Asp Ser Pro Arg Gly Val His Phe Arg	
65 70 75	
CGT GCT GGT CCA CGT CAG AAG GTG TAT TTC AGT TCG GAT GAT GTT CGT	411
Arg Ala Gly Pro Arg Gln Lys Val Tyr Phe Ser Ser Asp Asp Val Arg	
80 85 90	
GCT TGT ATT GTA ACT TGT GGT GGT TTG TGC CCT GGG CTA AAC ACA GTG	459
Ala Cys Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Leu Asn Thr Val	
95 100 105	
ATC AGA GAG ATT GTA CAT AGC CTC GAT TAT ATG TAT GGA GTC AAC AAA	507
Ile Arg Glu Ile Val His Ser Leu Asp Tyr Met Tyr Gly Val Asn Lys	
110 115 120 125	
GTC TTT GGT ATC GAT GGA GGC TAC AGG GGT TTC TAT TCC AAG AAT ATC	555
Val Phe Gly Ile Asp Gly Gly Tyr Arg Gly Phe Tyr Ser Lys Asn Ile	
130 135 140	
ATC AAT TTG ACA CCA AAG ACT GTT AAT GAC ATT CAT AAA CGT GGT GGT	603
Ile Asn Leu Thr Pro Lys Thr Val Asn Asp Ile His Lys Arg Gly Gly	
145 150 155	
ACA ATT CTT GGA TCA TCA CGA GGA GGC CAT GAT ACC ACA AAG ATT GTT	651
Thr Ile Leu Gly Ser Ser Arg Gly Gly His Asp Thr Thr Lys Ile Val	
160 165 170	
GAC AGC ATA CAG GAC CGT GAA ATT AAT CAG GTA TAT ATA ATC GGT GGT	699
Asp Ser Ile Gln Asp Arg Glu Ile Asn Gln Val Tyr Ile Ile Gly Gly	
175 180 185	
GAT GGA ACT CAG AAA GGA GCA GCT GTA ATA TAT GAG GAA ATC AGG CGG	747
Asp Gly Thr Gln Lys Gly Ala Ala Val Ile Tyr Glu Glu Ile Arg Arg	
190 195 200 205	
CGT GGT CTC AAA GTA ATT GTT GCT GGG ATC CCA AAG ACA ATT GAT AAT	795
Arg Gly Leu Lys Val Ile Val Ala Gly Ile Pro Lys Thr Ile Asp Asn	

35

210	215	220	
GAT ATC CCT GTT ATC GAC AAG TCA TTT GGT TTT GAT ACT GCT GTA GAG			843
Asp Ile Pro Val Ile Asp Lys Ser Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu			
225	230	235	
GAG GCT CAA CGT GCC ATA AAT GCA GCT CAT GTT GAA GCT GAA AGT GCT			891
Glu Ala Gln Arg Ala Ile Asn Ala Ala His Val Glu Ala Glu Ser Ala			
240	245	250	
GAA AAT GGT ATT GGT GTG GTG AAG CTA ATG GGA CGC TAT AGT GGA TTC			939
Glu Asn Gly Ile Gly Val Val Lys Leu Met Gly Arg Tyr Ser Gly Phe			
255	260	265	
ATC GCA ATG TAT GCC ACT TTG GCG AGC AGA GAT GTT GAT CTC TGT TTA			987
Ile Ala Met Tyr Ala Thr Leu Ala Ser Arg Asp Val Asp Leu Cys Leu			
270	275	280	285
ATT CCA GAG TCA CCC TTT TAT CTT GAA GGA GAT GGT GGA CTC TTT GAA			1035
Ile Pro Glu Ser Pro Phe Tyr Leu Glu Gly Asp Gly Gly Leu Phe Glu			
290	295	300	
TAC ATT GAA AAA AGG CTC AAA GAA AAT GGG CAC ATG GTT ATT GTG ATA			1083
Tyr Ile Glu Lys Arg Leu Lys Glu Asn Gly His Met Val Ile Val Ile			
305	310	315	
GCC GAA GGA GCA GGG CAA GAA CTT CTT GCA GAA GAG AAT GCG CAT GCC			1131
Ala Glu Gly Ala Gly Gln Glu Leu Leu Ala Glu Glu Asn Ala His Ala			
320	325	330	
AAA AAC GAA CAA GAT GCT TCG GGG AAC AAG CTT CTC CAG GAT GTT GGT			1179
Lys Asn Glu Gln Asp Ala Ser Gly Asn Lys Leu Leu Gln Asp Val Gly			
335	340	345	
TTG TGG ATT TCC CAA AAA ATC AGG GAT CAT TTT GCT ACA AAA ACT AAG			1227
Leu Trp Ile Ser Gln Lys Ile Arg Asp His Phe Ala Thr Lys Thr Lys			
350	355	360	365
ATG CCC ATT ACT CTT AAG TAT ATA GAT CCG ACT TAC ATG ATT CGT GCT			1275

Met Pro Ile Thr Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met Ile Arg Ala  
370 375 380  
GTT CCA AGT AAT GCC TCT GAT AAT GTA TAT TGC ACT CTT CTT GCT CAA 1323  
Val Pro Ser Asn Ala Ser Asp Asn Val Tyr Cys Thr Leu Leu Ala Gln  
385 390 395  
AGT TGT GTT CAT GGA GCA ATG GCA GGC TAC ACA GGT TTC ACC TCA GGA 1371  
Ser Cys Val His Gly Ala Met Ala Gly Tyr Thr Gly Phe Thr Ser Gly  
400 405 410  
CTT GTC AAT GGT CGC CAG ACT TAT ATA CCA TTC AAT CGT ATT ACC GAG 1419  
Leu Val Asn Gly Arg Gln Thr Tyr Ile Pro Phe Asn Arg Ile Thr Glu  
415 420 425  
AAA CAA AAT ATG GTG GTT ATA ACT GAC AGG ATG TGG GCA CGT CTT CTT 1467  
Lys Gln Asn Met Val Val Ile Thr Asp Arg Met Trp Ala Arg Leu Leu  
430 435 440 445  
TCG TCA ACC AAT CAG CCA AGC TTC TTG CGC GTG AAA GAC ATT GAA GAG 1515  
Ser Ser Thr Asn Gln Pro Ser Phe Leu Arg Val Lys Asp Ile Glu Glu  
450 455 460  
ATT AAA AAG GAG GAG CAG CCG CAA ACT CAA CTG TTG GAT GGG GAT AAC 1563  
Ile Lys Lys Glu Glu Gln Pro Gln Thr Gln Leu Leu Asp Gly Asp Asn  
465 470 475  
AAT GTA CAT GAG AAC TCA GGT CAC TGATACAGTA ATTACGAACT TGGCGTGACA 1617  
Asn Val His Glu Asn Ser Gly His  
480 485  
CACTGAAGTA ACTCTGTTGT AATCATTTGC CTGTGCAGTG GTTCTCTTGT TGTCTTTGAA 1677  
GCTTTTGCTG CTTACCATTG TGCCTTATAA AAACAGTCCT AGGAACTTAT TTGTTGAAGG 1737  
TTTTGGGATC TTCTGCATCA GATGTTGGCA GTAGTAACAG ATATATTCTT GCCTAATTCA 1797  
TCTAGAGTCC TAATTTCTTG AAGTGAAATT AGACATCTTT TTATAAAATA TTTTGTAAATA 1857  
AATTTAAATA GTGAGAACAT TTGCTATGCA CATAAATGAT GAACTCTGTG TGGCTGGATG 1917  
GTCTTTTGAG ATCTAAAATA GTCCAAGATT TTGGCAGAAA TCAGAAGTAG AGGCAGACTT 1977

T

1978

配列番号 : 2

配列の長さ : 4 8 5

配列の種類 : アミノ酸

配列

Met	Gly	Thr	Glu	Ser	Asn	Tyr	Gln	Met	Lys	Val	Val	Lys	Gly	Asp	Tyr
1				5				10					15		
Gly	Tyr	Val	Leu	Glu	Asp	Val	Pro	His	Leu	Thr	Asp	Tyr	Ile	Pro	Asp
			20					25					30		
Leu	Pro	Thr	Tyr	Asp	Asn	Pro	Leu	Arg	Ser	Asn	Pro	Ala	Tyr	Ser	Val
			35					40					45		
Val	Lys	Gln	Tyr	Phe	Val	Asp	Met	Asp	Asp	Thr	Val	Pro	Gln	Lys	Val
	50					55					60				
Val	Val	His	Lys	Asp	Ser	Pro	Arg	Gly	Val	His	Phe	Arg	Arg	Ala	Gly
65				70					75					80	
Pro	Arg	Gln	Lys	Val	Tyr	Phe	Ser	Ser	Asp	Asp	Val	Arg	Ala	Cys	Ile
			85						90					95	
Val	Thr	Cys	Gly	Gly	Leu	Cys	Pro	Gly	Leu	Asn	Thr	Val	Ile	Arg	Glu
			100					105					110		
Ile	Val	His	Ser	Leu	Asp	Tyr	Met	Tyr	Gly	Val	Asn	Lys	Val	Phe	Gly
			115					120					125		
Ile	Asp	Gly	Gly	Tyr	Arg	Gly	Phe	Tyr	Ser	Lys	Asn	Ile	Ile	Asn	Leu
	130					135						140			
Thr	Pro	Lys	Thr	Val	Asn	Asp	Ile	His	Lys	Arg	Gly	Gly	Thr	Ile	Leu
145				150						155				160	
Gly	Ser	Ser	Arg	Gly	Gly	His	Asp	Thr	Thr	Lys	Ile	Val	Asp	Ser	Ile
			165						170					175	
Gln	Asp	Arg	Glu	Ile	Asn	Gln	Val	Tyr	Ile	Ile	Gly	Gly	Asp	Gly	Thr

	180	185	190
Gln Lys Gly Ala Ala Val Ile Tyr Glu Glu Ile Arg Arg Arg Gly Leu			
195	200	205	
Lys Val Ile Val Ala Gly Ile Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Ile Pro			
210	215	220	
Val Ile Asp Lys Ser Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu Glu Ala Gln			
225	230	235	240
Arg Ala Ile Asn Ala Ala His Val Glu Ala Glu Ser Ala Glu Asn Gly			
245	250	255	
Ile Gly Val Val Lys Leu Met Gly Arg Tyr Ser Gly Phe Ile Ala Met			
260	265	270	
Tyr Ala Thr Leu Ala Ser Arg Asp Val Asp Leu Cys Leu Ile Pro Glu			
275	280	285	
Ser Pro Phe Tyr Leu Glu Gly Asp Gly Gly Leu Phe Glu Tyr Ile Glu			
290	295	300	
Lys Arg Leu Lys Glu Asn Gly His Met Val Ile Val Ile Ala Glu Gly			
305	310	315	320
Ala Gly Gln Glu Leu Leu Ala Glu Glu Asn Ala His Ala Lys Asn Glu			
325	330	335	
Gln Asp Ala Ser Gly Asn Lys Leu Leu Gln Asp Val Gly Leu Trp Ile			
340	345	350	
Ser Gln Lys Ile Arg Asp His Phe Ala Thr Lys Thr Lys Met Pro Ile			
355	360	365	
Thr Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met Ile Arg Ala Val Pro Ser			
370	375	380	
Asn Ala Ser Asp Asn Val Tyr Cys Thr Leu Leu Ala Gln Ser Cys Val			
385	390	395	400
His Gly Ala Met Ala Gly Tyr Thr Gly Phe Thr Ser Gly Leu Val Asn			
405	410	415	



Gly Arg Gln Thr Tyr Ile Pro Phe Asn Arg Ile Thr Glu Lys Gln Asn  
                     420                    425                    430  
 Met Val Val Ile Thr Asp Arg Met Trp Ala Arg Leu Leu Ser Ser Thr  
                     435                    440                    445  
 Asn Gln Pro Ser Phe Leu Arg Val Lys Asp Ile Glu Glu Ile Lys Lys  
                     450                    455                    460  
 Glu Glu Gln Pro Gln Thr Gln Leu Leu Asp Gly Asp Asn Asn Val His  
 465                    470                    475                    480  
 Glu Asn Ser Gly His  
                     485

配列番号 : 3

配列の長さ : 1778

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : フラベリアブロウニー (Flaberia brownii)

組織の種類 : 葉

直接の起源

ライブラリー名 : 緑葉mRNA由来λZAP II cDNAライブラリー

クローン名 : pPFK-FB1

配列

GTTAACAAGG GGGAAGTT ATG GAT AAT AAC ATC AGT TGT GAG ATG AAA GTT      51  
                     Met Asp Asn Asn Ile Ser Cys Glu Met Lys Val  
                     1                    5                    10  
 GAA ACA GGG GAT GCA GGC TAT GTG CTT GAA GAT GTG CCT CAC ATA ACT      99

Glu Thr Gly Asp Ala Gly Tyr Val Leu Glu Asp Val Pro His Ile Thr  
                     15                    20                    25  
 GAT TAC ATC CCT AAT CTC CCT ACC TAT CCT AAT CCA TTG CGT TCT AAT 147  
 Asp Tyr Ile Pro Asn Leu Pro Thr Tyr Pro Asn Pro Leu Arg Ser Asn  
                     30                    35                    40  
 CCT GCA TAT TCG GTT GTG AAG CAG TAC TTT GTT GAT GCG GAT GAT ACC 195  
 Pro Ala Tyr Ser Val Val Lys Gln Tyr Phe Val Asp Ala Asp Asp Thr  
                     45                    50                    55  
 GTG CCT CAA AAG GTT GTT GTA CAC AAG GAC GGT CCA AGA GGA ATA CAC 243  
 Val Pro Gln Lys Val Val Val His Lys Asp Gly Pro Arg Gly Ile His  
                     60                    65                    70                    75  
 TTT CGA CGT GCT GGT CCT CGT CAA AGG GTT TAT TTT GCA CCA GAT GAA 291  
 Phe Arg Arg Ala Gly Pro Arg Gln Arg Val Tyr Phe Ala Pro Asp Glu  
                     80                    85                    90  
 GTG CAT GCT GCT ATA GTA ACA TGT GGT GGT TTA TGT CCT GGG CTA AAC 339  
 Val His Ala Ala Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Leu Asn  
                     95                    100                    105  
 ACA GTG ATC AGG GAA ATT GTT TGC GCA CTT TAT CAC ATG TAT GGT GTC 387  
 Thr Val Ile Arg Glu Ile Val Cys Ala Leu Tyr His Met Tyr Gly Val  
                     110                    115                    120  
 ACC AAA GTT CTT GGG ATT GAT GGA GGG TAC AGA GGT TTT TAC TCA AAA 435  
 Thr Lys Val Leu Gly Ile Asp Gly Gly Tyr Arg Gly Phe Tyr Ser Lys  
                     125                    130                    135  
 AAC ACC ATC ACT TTG ACT CCA AAG GTT GTG AAT GAC ATC CAT AAA CGT 483  
 Asn Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Val Asn Asp Ile His Lys Arg  
                     140                    145                    150                    155  
 GGT GGT ACA ATT ATT GGC ACC TCT CGT GGG GGC CAT GAT AAA CCA AAG 531  
 Gly Gly Thr Ile Ile Gly Thr Ser Arg Gly Gly His Asp Lys Pro Lys  
                     160                    165                    170

ATA GTT GAC AGT ATT CAG GAT CGT GGT ATC AAT CAG GTT TAT ATA ATT	579
Ile Val Asp Ser Ile Gln Asp Arg Gly Ile Asn Gln Val Tyr Ile Ile	
175 180 185	
GGA GGA GAC GGT ACT CAA AAG GGA GCA GCT GTT ATT TAT CAG GAA GTG	627
Gly Gly Asp Gly Thr Gln Lys Gly Ala Ala Val Ile Tyr Gln Glu Val	
190 195 200	
AGA AGG CGT GGG CTT AAA GCT GTA GTG GCT GGG ATT CCT AAG ACA ATT	675
Arg Arg Arg Gly Leu Lys Ala Val Val Ala Gly Ile Pro Lys Thr Ile	
205 210 215	
GAT AAT GAC ATT CCG GTC ATT GAT AAG TCT TTT GGT TTT GAC ACG GCT	723
Asp Asn Asp Ile Pro Val Ile Asp Lys Ser Phe Gly Phe Asp Thr Ala	
220 225 230 235	
GTG GAA GAG GCT CAA CGT GCC ATT AAT GCT GCA CAT GTG GAG GCT GAA	771
Val Glu Glu Ala Gln Arg Ala Ile Asn Ala Ala His Val Glu Ala Glu	
240 245 250	
AGT GCT GAG AAT GGC ATA GGG GTG GTC AAA CTT ATG GGA CGC TAT AGT	819
Ser Ala Glu Asn Gly Ile Gly Val Val Lys Leu Met Gly Arg Tyr Ser	
255 260 265	
GGA TTC ATC GCA ATG TAT GCA ACT TTG GCT AGT CGA GAT GTT GAT TTA	867
Gly Phe Ile Ala Met Tyr Ala Thr Leu Ala Ser Arg Asp Val Asp Leu	
270 275 280	
TGT TTA ATT CCT GAA TCA CCT TTT TAT CTT GAG GGA GAA GGT GGA CTT	915
Cys Leu Ile Pro Glu Ser Pro Phe Tyr Leu Glu Gly Glu Gly Gly Leu	
285 290 295	
TTA GAA TAT GTA GAA AAA CGT CTC AAG GAC GAT GGA CAC ATG GTC ATC	963
Leu Glu Tyr Val Glu Lys Arg Leu Lys Asp Asp Gly His Met Val Ile	
300 305 310 315	
GTT GTA GCA GAA GGT GCT GGT CAG GAG CTG CTT GCA GCA GAA AAC TTG	1011
Val Val Ala Glu Gly Ala Gly Gln Glu Leu Leu Ala Ala Glu Asn Leu	

320	325	330	
AAA ACT TCA ACC GCA AAA GAT GCT TCT GGA AAT AAA CTA CTT CAC GAT			1059
Lys Thr Ser Thr Ala Lys Asp Ala Ser Gly Asn Lys Leu Leu His Asp			
335	340	345	
GTC GGA TTG TGG ATT TCT GAT AAG ATT AAG GCT CAC TTT GCT AAA ATT			1107
Val Gly Leu Trp Ile Ser Asp Lys Ile Lys Ala His Phe Ala Lys Ile			
350	355	360	
CCT CCC ATG CCT ATT ACT CTC AAA TAC ATA GAT CCA ACT TAC ATG ATC			1155
Pro Pro Met Pro Ile Thr Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met Ile			
365	370	375	
CGT GCG GTT CCA AGT AAT GCA TCT GAT AAT GTA TAC TGC ACT CTC CTT			1203
Arg Ala Val Pro Ser Asn Ala Ser Asp Asn Val Tyr Cys Thr Leu Leu			
380	385	390	395
GCT CAA AGT TGT GTT CAT GGA GTG ATG GCG GGC TAC ACC GGC TTC ACA			1251
Ala Gln Ser Cys Val His Gly Val Met Ala Gly Tyr Thr Gly Phe Thr			
400	405	410	
AGT GGG CTT GTC AAT GGT AGA CAG ACT TAT ATT CCA TTT AAT CGT ATC			1299
Ser Gly Leu Val Asn Gly Arg Gln Thr Tyr Ile Pro Phe Asn Arg Ile			
415	420	425	
ACT GAG AAG CAG AAT AAC GTT GTG ATA ACC GAT AGG ATG TGG GCA AGG			1347
Thr Glu Lys Gln Asn Asn Val Val Ile Thr Asp Arg Met Trp Ala Arg			
430	435	440	
CTT CTG TCA TCC ACC AAC CAA CCA AGC TTT TTG CGA CCC CAA GAC GTT			1395
Leu Leu Ser Ser Thr Asn Gln Pro Ser Phe Leu Arg Pro Gln Asp Val			
445	450	455	
ATT GAA GTC CAG AAA CAA GAA GAA CCA CCA AGT CAG TTA TTG GAT GGA			1443
Ile Glu Val Gln Lys Gln Glu Glu Pro Pro Ser Gln Leu Leu Asp Gly			
460	465	470	475
GAC AGC AGC AAG CCA AAT GAC ATC TAAATCTATA AATTAAGAAT ATTCGCCATT			1497

Asp Ser Ser Lys Pro Asn Asp Ile

480

TTAATGCACA AAAATAATAG CACTGCAAAT TTGGTTTTGT GGATGCAATT CATCATGTTT 1557  
 TTGCAGAATT TTCAAGATAA AGTTGCTTAT TCTTGACTGG ATTGATCATG GATTTAAGTC 1617  
 TCTTTGCAGG AATGAATTTT CCTCCAAAAA AAGAACTGC ATAAACCTA GTTTTGTGT 1677  
 GTTGGGATCA AGCTATTGGT AGTCAAGTTA GAAAGTTTAA GCTGCAGTTT GTAATTGTTT 1737  
 GTGTTTGTG GGTAAAGTGG CTTTGTTTCAT CAGAAAAAAA A 1778

配列番号 : 4

配列の長さ : 484

配列の種類 : アミノ酸

配列

Met	Asp	Asn	Asn	Ile	Ser	Cys	Glu	Met	Lys	Val	Glu	Thr	Gly	Asp	Ala
1				5					10					15	
Gly	Tyr	Val	Leu	Glu	Asp	Val	Pro	His	Ile	Thr	Asp	Tyr	Ile	Pro	Asn
			20						25					30	
Leu	Pro	Thr	Tyr	Pro	Asn	Pro	Leu	Arg	Ser	Asn	Pro	Ala	Tyr	Ser	Val
			35					40					45		
Val	Lys	Gln	Tyr	Phe	Val	Asp	Ala	Asp	Asp	Thr	Val	Pro	Gln	Lys	Val
			50				55					60			
Val	Val	His	Lys	Asp	Gly	Pro	Arg	Gly	Ile	His	Phe	Arg	Arg	Ala	Gly
			65				70				75			80	
Pro	Arg	Gln	Arg	Val	Tyr	Phe	Ala	Pro	Asp	Glu	Val	His	Ala	Ala	Ile
				85					90					95	
Val	Thr	Cys	Gly	Gly	Leu	Cys	Pro	Gly	Leu	Asn	Thr	Val	Ile	Arg	Glu
			100					105					110		
Ile	Val	Cys	Ala	Leu	Tyr	His	Met	Tyr	Gly	Val	Thr	Lys	Val	Leu	Gly
				115				120					125		
Ile	Asp	Gly	Gly	Tyr	Arg	Gly	Phe	Tyr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ile	Thr	Leu

130	135	140	
Thr Pro Lys Val Val Asn Asp Ile His Lys Arg Gly Gly Thr Ile Ile			
145	150	155	160
Gly Thr Ser Arg Gly Gly His Asp Lys Pro Lys Ile Val Asp Ser Ile			
165	170	175	
Gln Asp Arg Gly Ile Asn Gln Val Tyr Ile Ile Gly Gly Asp Gly Thr			
180	185	190	
Gln Lys Gly Ala Ala Val Ile Tyr Gln Glu Val Arg Arg Arg Gly Leu			
195	200	205	
Lys Ala Val Val Ala Gly Ile Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Ile Pro			
210	215	220	
Val Ile Asp Lys Ser Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu Glu Ala Gln			
225	230	235	240
Arg Ala Ile Asn Ala Ala His Val Glu Ala Glu Ser Ala Glu Asn Gly			
245	250	255	
Ile Gly Val Val Lys Leu Met Gly Arg Tyr Ser Gly Phe Ile Ala Met			
260	265	270	
Tyr Ala Thr Leu Ala Ser Arg Asp Val Asp Leu Cys Leu Ile Pro Glu			
275	280	285	
Ser Pro Phe Tyr Leu Glu Gly Glu Gly Gly Leu Leu Glu Tyr Val Glu			
290	295	300	
Lys Arg Leu Lys Asp Asp Gly His Met Val Ile Val Val Ala Glu Gly			
305	310	315	320
Ala Gly Gln Glu Leu Leu Ala Ala Glu Asn Leu Lys Thr Ser Thr Ala			
325	330	335	
Lys Asp Ala Ser Gly Asn Lys Leu Leu His Asp Val Gly Leu Trp Ile			
340	345	350	
Ser Asp Lys Ile Lys Ala His Phe Ala Lys Ile Pro Pro Met Pro Ile			
355	360	365	

45

Thr Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met Ile Arg Ala Val Pro Ser  
370 375 380  
Asn Ala Ser Asp Asn Val Tyr Cys Thr Leu Leu Ala Gln Ser Cys Val  
385 390 395 400  
His Gly Val Met Ala Gly Tyr Thr Gly Phe Thr Ser Gly Leu Val Asn  
405 410 415  
Gly Arg Gln Thr Tyr Ile Pro Phe Asn Arg Ile Thr Glu Lys Gln Asn  
420 425 430  
Asn Val Val Ile Thr Asp Arg Met Trp Ala Arg Leu Leu Ser Ser Thr  
435 440 445  
Asn Gln Pro Ser Phe Leu Arg Pro Gln Asp Val Ile Glu Val Gln Lys  
450 455 460  
Gln Glu Glu Pro Pro Ser Gln Leu Leu Asp Gly Asp Ser Ser Lys Pro  
465 470 475 480  
Asn Asp Ile

配列番号 : 5

配列の長さ : 1623

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : オリザサティバ (Oryza sativa L. )

品種名 : 月の光

組織の種類 : 未熟胚由来カルス

直接の起源

ライブラリー名 : カルスmRNA由来λZAP II cDNAライブラリー

クローン名 : pPFK-OS1

## 配列

TG GTA GTC GCA CAC ATG CGG CAC GTC CTC GAT CTA CCG ACA TAC TCA AAT	50
Val Val Ala His Met Arg His Val Leu Asp Leu Pro Thr Tyr Ser Asn	
1 5 10 15	
CCA CTG CAA GAT AAC CCG GCA TAC TCG GTT GTG AAG CAA TAC TTT GTA	98
Pro Leu Gln Asp Asn Pro Ala Tyr Ser Val Val Lys Gln Tyr Phe Val	
20 25 30	
AAC CCA GAT GAC ACT GTC TGC CAG AAG GCC ATT GTT CAC AAG GAT GGC	146
Asn Pro Asp Asp Thr Val Cys Gln Lys Ala Ile Val His Lys Asp Gly	
35 40 45	
CCT AGA GGC AAC CAC TTC CGT CGT GCT GGG CCT CGA CAG AGG GTG TTT	194
Pro Arg Gly Asn His Phe Arg Arg Ala Gly Pro Arg Gln Arg Val Phe	
50 55 60	
TTT GAA TCG GAT GAG GTC CAT GCA TGC ATT GTC ACA TGT GGA GGA CTG	242
Phe Glu Ser Asp Glu Val His Ala Cys Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu	
65 70 75 80	
TGC CCT GGA CTG AAC ACT GTC ATT AGG GAA ATT GTT TGT GGC CTA AAT	290
Cys Pro Gly Leu Asn Thr Val Ile Arg Glu Ile Val Cys Gly Leu Asn	
85 90 95	
GAC ATG TAT GGT GTC AGT AGG GTA CTT GGA ATT CAG GGT GGG TAT AGA	338
Asp Met Tyr Gly Val Ser Arg Val Leu Gly Ile Gln Gly Gly Tyr Arg	
100 105 110	
GGT TTC TAT GCT TGT AAC ACC ATT GAC TTG AGT CCA AAG AGT GTA AAC	386
Gly Phe Tyr Ala Cys Asn Thr Ile Asp Leu Ser Pro Lys Ser Val Asn	
115 120 125	
GAC AAT CAC AAA AGG GGT GGA ACT GTT CTT GGG ACA TCA CGT GGA GGC	434
Asp Ile His Lys Arg Gly Gly Thr Val Leu Gly Thr Ser Arg Gly Gly	
130 135 140	
CAT GAC ACC ATG AAG ATT GTT GAC AGC ATC CAG GAT CGT GGT ATA AAT	482



His Asp Thr Met Lys Ile Val Asp Ser Ile Gln Asp Arg Gly Ile Asn  
 145 150 155 160  
 CAG GTT TAT GTA ATT GGT GGT GAT GGT ACT CAA AGG GGT GCA GGA GTG 530  
 Gln Val Tyr Val Ile Gly Gly Asp Gly Thr Gln Arg Gly Ala Gly Val  
 165 170 175  
 ATT TTT GAA GAG ATT AGA AGA CGT GGT CTC AAG GTT GCT GTT GCT GGC 578  
 Ile Phe Glu Glu Ile Arg Arg Arg Gly Leu Lys Val Ala Val Ala Gly  
 180 185 190  
 ATT CCA AAG ACG ATT GAT AAT GAT ATA CCA GTA ATT GAC AGA TCA TTT 626  
 Ile Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Ile Pro Val Ile Asp Arg Ser Phe  
 195 200 205  
 GGT TTC GAC ACT GCA GTT GAG GAG GCC CAA CGT GCA ATA AAT GCT GCT 674  
 Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu Glu Ala Gln Arg Ala Ile Asn Ala Ala  
 210 215 220  
 CAT GTA GAA GCT GGA AGC GCC GAG AAT GGT ATA GGC CTC GTA AAG CTA 722  
 His Val Glu Ala Gly Ser Ala Glu Asn Gly Ile Gly Leu Val Lys Leu  
 225 230 235 240  
 ATG GGT CGA CAC AGT GGT TTT ATT GCA CAC TAT GCT ACT CTA GCC AGC 770  
 Met Gly Arg His Ser Gly Phe Ile Ala His Tyr Ala Thr Leu Ala Ser  
 245 250 255  
 AGA GAC GTG GAT TGT TGT TTG ATT CCA GAG TCA CCT TTC TAT CTG GAA 818  
 Arg Asp Val Asp Cys Cys Leu Ile Pro Glu Ser Pro Phe Tyr Leu Glu  
 260 265 270  
 GGT GAA GGT GGC CTT TTT AGA TAT TTG GAA AAG CGT CTG AAG GAG AAT 866  
 Gly Glu Gly Gly Leu Phe Arg Tyr Leu Glu Lys Arg Leu Lys Glu Asn  
 275 280 285  
 GGT CAT ATG GTT ATC GTT GTT GCG GAG GGT GCA GGG CAG AAA CTT ATT 914  
 Gly His Met Val Ile Val Val Ala Glu Gly Ala Gly Gln Lys Leu Ile  
 290 295 300

AAT GAA ACA AAG GAA TCA ATG GGG AAA GAT GCT TCA GGC AAT TCG ATT	962
Asn Glu Thr Lys Glu Ser Met Gly Lys Asp Ala Ser Gly Asn Ser Ile	
305 310 315 320	
CTT CTT GAT GTT GGT CTT TGG TTA TCT CAA AAG ATA AAA GAG CAT TTC	1010
Leu Leu Asp Val Gly Leu Trp Leu Ser Gln Lys Ile Lys Glu His Phe	
325 330 335	
AAG AAA ATC AAG ACT ACT ATA AAT CTC AAG TAT ATA GAT CCT ACA TAC	1058
Lys Lys Ile Lys Thr Thr Ile Asn Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr	
340 345 350	
ATG ATA CGT GCC ATT CCT AGC AAT GCA TCT GAC AAT GTG TAT TGC ACA	1106
Met Ile Arg Ala Ile Pro Ser Asn Ala Ser Asp Asn Val Tyr Cys Thr	
355 360 365	
CTG TTG GCA CAC AGG GTG GTT CAT GGA GCC ATG GCT GGA TAC ACT GGT	1154
Leu Leu Ala His Arg Val Val His Gly Ala Met Ala Gly Tyr Thr Gly	
370 375 380	
TTC ACT GTT GGC CAA GTA AAT GGT CGG CAT TGC TAT ATC CCG TTT TAC	1202
Phe Thr Val Gly Gln Val Asn Gly Arg His Cys Tyr Ile Pro Phe Tyr	
385 400 405 410	
AGG ATC ACA GAG AAG CAG AAC AAA GTT TCA ATT ACT GAT AGG ATG TGG	1250
Arg Ile Thr Glu Lys Gln Asn Lys Val Ser Ile Thr Asp Arg Met Trp	
415 420 425	
GCA AGA CTT CTC TCC TCA ACC AAC CAG CCA AGT TTC CTC AGC AAG AAA	1298
Ala Arg Leu Leu Ser Ser Thr Asn Gln Pro Ser Phe Leu Ser Lys Lys	
430 435 440	
GAT GTG GAG GAC GCA AAG ATG GAA GAA GAG AGA GCA TCC AAG TTT TTC	1346
Asp Val Glu Asp Ala Lys Met Glu Glu Glu Arg Ala Ser Lys Phe Phe	
445 450 455	
GAT GGC CCG CCT CCC AAC CCC AAG GTT GAA GAC AAA GTC GCT TCC AAT	1394
Asp Gly Pro Pro Pro Asn Pro Lys Val Glu Asp Lys Val Ala Ser Asn	

460                      465                      470  
 GGC AAG GCT GTG AAG TGAGGCAGAA GGCTACTGAT CTATTATGTGC AGATGGATTA 1449  
 Gly Lys Ala Val Lys  
 475  
 ATTATTACTC AATAATGTCA GTAATCTATC TATGGCTAGT GAGATGGATT AGTAAATAAT 1509  
 ATTAGTATAT CTATGGCAAG TGATGCTCAG CTCTTCCTGT CCAAATTAATA ATGCCGAGAA 1569  
 TAGATCTCCT CTAGCAGGTT ATCGTCATTA TATTTAAAAA AAAAAAAAAA AAAA 1623

配列番号 : 6

配列の長さ : 479

配列の種類 : アミノ酸

配列

Val	Val	Ala	His	Met	Arg	His	Val	Leu	Asp	Leu	Pro	Thr	Tyr	Ser	Asn
1				5					10					15	
Pro	Leu	Gln	Asp	Asn	Pro	Ala	Tyr	Ser	Val	Val	Lys	Gln	Tyr	Phe	Val
			20					25					30		
Asn	Pro	Asp	Asp	Thr	Val	Cys	Gln	Lys	Ala	Ile	Val	His	Lys	Asp	Gly
			35					40					45		
Pro	Arg	Gly	Asn	His	Phe	Arg	Arg	Ala	Gly	Pro	Arg	Gln	Arg	Val	Phe
	50					55				60					
Phe	Glu	Ser	Asp	Glu	Val	His	Ala	Cys	Ile	Val	Thr	Cys	Gly	Gly	Leu
65				70						75				80	
Cys	Pro	Gly	Leu	Asn	Thr	Val	Ile	Arg	Glu	Ile	Val	Cys	Gly	Leu	Asn
				85						90				95	
Asp	Met	Tyr	Gly	Val	Ser	Arg	Val	Leu	Gly	Ile	Gln	Gly	Gly	Tyr	Arg
				100						105				110	
Gly	Phe	Tyr	Ala	Cys	Asn	Thr	Ile	Asp	Leu	Ser	Pro	Lys	Ser	Val	Asn
				115						120				125	
Asp	Ile	His	Lys	Arg	Gly	Gly	Thr	Val	Leu	Gly	Thr	Ser	Arg	Gly	Gly

130	135	140	
His Asp Thr Met Lys Ile Val Asp Ser Ile Gln Asp Arg Gly Ile Asn			
145	150	155	160
Gln Val Tyr Val Ile Gly Gly Asp Gly Thr Gln Arg Gly Ala Gly Val			
165	170	175	
Ile Phe Glu Glu Ile Arg Arg Arg Gly Leu Lys Val Ala Val Ala Gly			
180	185	190	
Ile Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Ile Pro Val Ile Asp Arg Ser Phe			
195	200	205	
Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu Glu Ala Gln Arg Ala Ile Asn Ala Ala			
210	215	220	
His Val Glu Ala Gly Ser Ala Glu Asn Gly Ile Gly Leu Val Lys Leu			
225	230	235	240
Met Gly Arg His Ser Gly Phe Ile Ala His Tyr Ala Thr Leu Ala Ser			
245	250	255	
Arg Asp Val Asp Cys Cys Leu Ile Pro Glu Ser Pro Phe Tyr Leu Glu			
260	265	270	
Gly Glu Gly Gly Leu Phe Arg Tyr Leu Glu Lys Arg Leu Lys Glu Asn			
275	280	285	
Gly His Met Val Ile Val Val Ala Glu Gly Ala Gly Gln Lys Leu Ile			
290	295	300	
Asn Glu Thr Lys Glu Ser Met Gly Lys Asp Ala Ser Gly Asn Ser Ile			
305	310	315	320
Leu Leu Asp Val Gly Leu Trp Leu Ser Gln Lys Ile Lys Glu His Phe			
325	330	335	
Lys Lys Ile Lys Thr Thr Ile Asn Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr			
340	345	350	
Met Ile Arg Ala Ile Pro Ser Asn Ala Ser Asp Asn Val Tyr Cys Thr			
355	360	365	

Leu Leu Ala His Arg Val Val His Gly Ala Met Ala Gly Tyr Thr GLy  
370 375 380  
Phe Thr Val Gly Gln Val Asn Gly Arg His Cys Tyr Ile Pro Phe Tyr  
385 400 405 410  
Arg Ile Thr Glu Lys Gln Asn Lys Val Ser Ile Thr Asp Arg Met Trp  
415 420 425  
Ala Arg Leu Leu Ser Ser Thr Asn Gln Pro Ser Phe Leu Ser Lys Lys  
430 435 440  
Asp Val Glu Asp Ala Lys Met Glu Glu Glu Arg Ala Ser Lys Phe Phe  
445 450 455  
Asp Gly Pro Pro Pro Asn Pro Lys Val Glu Asp Lys Val Ala Ser Asn  
460 465 470  
Gly Lys Ala Val Lys  
475

配列番号 : 7

配列の長さ : 2048

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ジーメイズ (Zea mays L. )

組織の種類 : 胚乳由来カルス

直接の起源

ライブラリー名 : カルスmRNA由来  $\lambda$  gt10 cDNAライブラリー

クローン名 : pPFK-ZM1

配列

CGAACCCGAA CCCTCCAAGC CGGCAGGCCG GAGCAGAGCG CGCTCCAAGC TGAATCCCCC 60

CATCTCCTAT CGCCGTCGAA AGCCGCAGGT CCATTATAAC TTTTATGAC CTGTCTGGG	120
ATG GCT GTT GCT TTC AAA GCA AGT ACA AGT TCT GTC ACA CAG CAA CAT	168
Met Ala Val Ala Phe Lys Ala Ser Thr Ser Ser Val Thr Gln Gln His	
1 5 10 15	
TGG TCA AGT CCA ACA AAG GAC CAG TGT CAA TAT GGT TTC ACT CAT TTA	216
Trp Ser Ser Pro Thr Lys Asp Gln Cys Gln Tyr Gly Phe Thr His Leu	
20 25 30	
AGC AGG CAA AAG TGC AGA AAA AGA GCA CTG TGT GTG ACA GCT ATA TCA	264
Ser Arg Gln Lys Cys Arg Lys Arg Ala Leu Cys Val Thr Ala Ile Ser	
35 40 45	
GGG AAG CTA GAC CTA GAT TTC ACT GAT CCT TCT TGG AAC CAA AAG TAC	312
Gly Lys Leu Asp Leu Asp Phe Thr Asp Pro Ser Trp Asn Gln Lys Tyr	
50 55 60	
CAG GAA GAC TGG AAC AGG CGT TTT AGT TTG CCA CAT ATT AAT GAT ATA	360
Gln Glu Asp Trp Asn Arg Arg Phe Ser Leu Pro His Ile Asn Asp Ile	
65 70 75 80	
TAT GAT TTG GAA CCA AGA AGA ACT ACA TTC TCT TTG AAG AAA AAC AGA	408
Tyr Asp Leu Glu Pro Arg Arg Thr Thr Phe Ser Leu Lys Lys Asn Arg	
85 90 95	
ATT CCC CTG GGT GAT GGT GAT GGC TCA TCA ACT GAT ATG TGG AAC GGT	456
Ile Pro Leu Gly Asp Gly Asp Gly Ser Ser Thr Asp Met Trp Asn Gly	
100 105 110	
TAT GTA AAT AAG AAT GAT AGA GCC CTT TTG AAG GTG ATA AAG TAT GCA	504
Tyr Val Asn Lys Asn Asp Arg Ala Leu Leu Lys Val Ile Lys Tyr Ala	
115 120 125	
TCT CCT ACT TCT GCT GGA GCT GAG TGC ATT GAT CCT GAT TGT AGC TGG	552
Ser Pro Thr Ser Ala Gly Ala Glu Cys Ile Asp Pro Asp Cys Ser Trp	
130 135 140	
GTG GAA CAC TGG GTT CAT CGT GCA GGT CCT CGT AAG GAG ATA TAT TAC	600

Val	Glu	His	Trp	Val	His	Arg	Ala	Gly	Pro	Arg	Lys	Glu	Ile	Tyr	Tys	
145					150					155					160	
GAA	CCT	GAA	GAA	GTA	AAG	GCT	GCC	ATT	GTT	ACC	TGT	GGA	GGG	CTC	TGT	648
Glu	Pro	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Ala	Ile	Val	Thr	Cys	Gly	Gly	Leu	Cys	
					165					170					175	
CCT	GGT	CTA	AAT	GAT	GTC	ATT	AGG	CAG	ATA	GTA	TTT	ACT	TTG	GAG	ACT	696
Pro	Gly	Leu	Asn	Asp	Val	Ile	Arg	Gln	Ile	Val	Phe	Thr	Leu	Glu	Thr	
					180					185					190	
TAT	GGG	GTG	AAG	AAT	ATT	GTT	GGA	ATC	CCA	TTT	GGT	TAT	CGT	GGA	TTT	744
Tyr	Gly	Val	Lys	Asn	Ile	Val	Gly	Ile	Pro	Phe	Gly	Tyr	Arg	Gly	Phe	
					195					200					205	
TTT	GAG	AAA	GGC	TTA	AAA	GAA	ATG	CCG	CTC	TCG	CGT	GAC	GTG	GTG	GAA	792
Phe	Glu	Lys	Gly	Leu	Lys	Glu	Met	Pro	Leu	Ser	Arg	Asp	Val	Val	Glu	
					210					215					220	
AAC	ATA	AAT	CTT	TCT	GGA	GGA	AGT	TTC	CTA	GGA	GTC	TCT	CGT	GGA	GGA	840
Asn	Ile	Asn	Leu	Ser	Gly	Gly	Ser	Phe	Leu	Gly	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	
					225					230					235	
GCT	AAA	ACT	AGT	GAG	ATT	GTA	GAT	AGC	ATA	CAA	GCC	AGA	AGA	ATT	GAC	888
Ala	Lys	Thr	Ser	Glu	Ile	Val	Asp	Ser	Ile	Gln	Ala	Arg	Arg	Ile	Asp	
					245					250					255	
ATG	CTA	TTT	GTA	ATT	GGT	GGA	AAT	GGT	AGC	CAT	GCA	GGA	GCT	AAT	GCT	936
Met	Leu	Phe	Val	Ile	Gly	Gly	Asn	Gly	Ser	His	Ala	Gly	Ala	Asn	Ala	
					260					265					270	
ATT	CAT	GAG	GAG	TGT	CGA	AAG	AGA	AAA	CTG	AAA	GTT	TCA	GTT	GTA	GCA	984
Ile	His	Glu	Glu	Cys	Arg	Lys	Arg	Lys	Leu	Lys	Val	Ser	Val	Val	Ala	
					275					280					285	
GTC	CCA	AAG	ACA	ATT	GAT	AAT	GAT	ATA	CTT	TTT	ATG	GAT	AAG	ACG	TTT	1032
Val	Pro	Lys	Thr	Ile	Asp	Asn	Asp	Ile	Leu	Phe	Met	Asp	Lys	Thr	Phe	
					290					295					300	

GGT TTT GAT ACA GCT GTA GAG AAA GCT CAG CGT GCT ATC AAT TCT GCC 1080  
 Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu Lys Ala Gln Arg Ala Ile Asn Ser Ala  
 305 310 315 320  
 TAT ATA GAG GCA CGT AGT GCA TAC CAC GGA ATT GGG TTA GTA AAA TTA 1128  
 Tyr Ile Glu Ala Arg Ser Ala Tyr His Gly Ile Gly Leu Val Lys Leu  
 325 330 335  
 ATG GGA AGA AGT AGT GGA TTC ATA GCC ATG CAT GCT TCT CTT TCC AGT 1176  
 Met Gly Arg Ser Ser Gly Phe Ile Ala Met His Ala Ser Leu Ser Ser  
 340 345 350  
 GGA CAG ATT GAT GTT TGC CTG ATA CCT GAG GTA TCC TTC ACA CTT GAT 1224  
 Gly Gln Ile Asp Val Cys Leu Ile Pro Glu Val Ser Phe Thr Leu Asp  
 355 360 365  
 GGA GAA CAT GGT GTC TTG CGA CAC CTT GAG CAT TTA CTT AAT ACA AAG 1272  
 Gly Glu His Gly Val Leu Arg His Leu Glu His Leu Leu Asn Thr Lys  
 370 375 380  
 GGA TTT TGT GTG GTT TGT GTT GCT GAA GGT GCA GGG CAG GAT TTA CTC 1320  
 Gly Phe Cys Val Val Cys Val Ala Glu Gly Ala Gly Gln Asp Leu Leu  
 385 390 395 400  
 CAA AAA TCA AAT GCA ACT GAC GCT TCA GGA AAT GTG ATA CTT AGT GAC 1368  
 Gln Lys Ser Asn Ala Thr Asp Ala Ser Gly Asn Val Ile Leu Ser Asp  
 405 410 415  
 TTT GGT GTC CAC ATG CAG CAG AAG ATC AAG AAG CAT TTC AAG GAC ATC 1416  
 Phe Gly Val His Met Gln Gln Lys Ile Lys Lys His Phe Lys Asp Ile  
 420 425 430  
 GGT GTT CCC GCT GAT CTA AAA TAC ATT GAT CCA ACA TAT ATG GTT CGG 1464  
 Gly Val Pro Ala Asp Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met Val Arg  
 435 440 445  
 GCC TGC CGG GCA AAT GCA TCT GAT GCT ATT CTC TGC ACC GTA CTT GGG 1512  
 Ala Cys Arg Ala Asn Ala Ser Asp Ala Ile Leu Cys Thr Val Leu Gly



450                      455                      460  
 CAA AAT GCT GTC CAT GGA GCA TTT GCT GGG TTC AGT GGC ATC ACG TCA 1560  
 Gln Asn Ala Val His Gly Ala Phe Ala Gly Phe Ser Gly Ile Thr Ser  
 465                      470                      475                      480  
 GGT GTT TGC AAC ACA CAT TAT GTC TAC CTT CCC ATC ACA GAG GTC ATT 1608  
 Gly Val Cys Asn Thr His Tyr Val Tyr Leu Pro Ile Thr Glu Val Ile  
                          485                      490                      495  
 ACA ACA CCA AAG CAC GTC AAC CCC AAC AGC AGA ATG TGG CAC CGC TGC 1656  
 Thr Thr Pro Lys His Val Asn Pro Asn Ser Arg Met Trp His Arg Cys  
                          500                      505                      510  
 CTC ACA TCC ACT GGC CAG CCA GAC TTC CAT TGACTACTTC ATTAACACCT 1706  
 Leu Thr Ser Thr Gly Gln Pro Asp Phe His  
                          515                      520  
 GAGAGCAAGG CGCCAGGAGA ATATTTAATC CCACAAGGGA CTGCTAACAG GAACTTGAAT 1766  
 AAATCTGGCT AACCCAAAAT TTTGTGAGGC TGGAGGAGCT CATAACGAAA TTGCCAGAGC 1826  
 CACCCCTGG TCATCCAGAC GTTGTAAGCA TGCATACCCT TTCTAGTGGT TTGCAATCCC 1886  
 AAGTGAATT AAAAGTTAGG AGTTGTTTGT TCTCCAAACA ATTCACCATA ATCCCACCAG 1946  
 CACCAAACCTG GCTCCAGCCT TGTGAGATGT TTTATTGATG ATGTACTATG CATAATAGGC 2006  
 AATTGGATAT TCTTACTGGG AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA 2048

配列番号 : 8

配列の長さ : 522

配列の種類 : アミノ酸

配列

Met Ala Val Ala Phe Lys Ala Ser Thr Ser Ser Val Thr Gln Gln His

1                      5                      10                      15

Trp Ser Ser Pro Thr Lys Asp Gln Cys Gln Tyr Gly Phe Thr His Leu

20                      25                      30

Ser Arg Gln Lys Cys Arg Lys Arg Ala Leu Cys Val Thr Ala Ile Ser

35	40	45	
Gly Lys Leu Asp Leu Asp Phe Thr Asp Pro Ser Trp Asn Gln Lys Tyr			
50	55	60	
Gln Glu Asp Trp Asn Arg Arg Phe Ser Leu Pro His Ile Asn Asp Ile			
65	70	75	80
Tyr Asp Leu Glu Pro Arg Arg Thr Thr Phe Ser Leu Lys Lys Asn Arg			
85	90	95	
Ile Pro Leu Gly Asp Gly Asp Gly Ser Ser Thr Asp Met Trp Asn Gly			
100	105	110	
Tyr Val Asn Lys Asn Asp Arg Ala Leu Leu Lys Val Ile Lys Tyr Ala			
115	120	125	
Ser Pro Thr Ser Ala Gly Ala Glu Cys Ile Asp Pro Asp Cys Ser Trp			
130	135	140	
Val Glu His Trp Val His Arg Ala Gly Pro Arg Lys Glu Ile Tyr Tys			
145	150	155	160
Glu Pro Glu Glu Val Lys Ala Ala Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu Cys			
165	170	175	
Pro Gly Leu Asn Asp Val Ile Arg Gln Ile Val Phe Thr Leu Glu Thr			
180	185	190	
Tyr Gly Val Lys Asn Ile Val Gly Ile Pro Phe Gly Tyr Arg Gly Phe			
195	200	205	
Phe Glu Lys Gly Leu Lys Glu Met Pro Leu Ser Arg Asp Val Val Glu			
210	215	220	
Asn Ile Asn Leu Ser Gly Gly Ser Phe Leu Gly Val Ser Arg Gly Gly			
225	230	235	240
Ala Lys Thr Ser Glu Ile Val Asp Ser Ile Gln Ala Arg Arg Ile Asp			
245	250	255	
Met Leu Phe Val Ile Gly Gly Asn Gly Ser His Ala Gly Ala Asn Ala			
260	265	270	

Ile His Glu Glu Cys Arg Lys Arg Lys Leu Lys Val Ser Val Val Ala  
275 280 285  
Val Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Ile Leu Phe Met Asp Lys Thr Phe  
290 295 300  
Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu Lys Ala Gln Arg Ala Ile Asn Ser Ala  
305 310 315 320  
Tyr Ile Glu Ala Arg Ser Ala Tyr His Gly Ile Gly Leu Val Lys Leu  
325 330 335  
Met Gly Arg Ser Ser Gly Phe Ile Ala Met His Ala Ser Leu Ser Ser  
340 345 350  
Gly Gln Ile Asp Val Cys Leu Ile Pro Glu Val Ser Phe Thr Leu Asp  
355 360 365  
Gly Glu His Gly Val Leu Arg His Leu Glu His Leu Leu Asn Thr Lys  
370 375 380  
Gly Phe Cys Val Val Cys Val Ala Glu Gly Ala Gly Gln Asp Leu Leu  
385 390 395 400  
Gln Lys Ser Asn Ala Thr Asp Ala Ser Gly Asn Val Ile Leu Ser Asp  
405 410 415  
Phe Gly Val His Met Gln Gln Lys Ile Lys Lys His Phe Lys Asp Ile  
420 425 430  
Gly Val Pro Ala Asp Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met Val Arg  
435 440 445  
Ala Cys Arg Ala Asn Ala Ser Asp Ala Ile Leu Cys Thr Val Leu Gly  
450 455 460  
Gln Asn Ala Val His Gly Ala Phe Ala Gly Phe Ser Gly Ile Thr Ser  
465 470 475 480  
Gly Val Cys Asn Thr His Tyr Val Tyr Leu Pro Ile Thr Glu Val Ile  
485 490 495  
Thr Thr Pro Lys His Val Asn Pro Asn Ser Arg Met Trp His Arg Cys

500                      505                      510  
 Leu Thr Ser Thr Gly Gln Pro Asp Phe His  
 515                      520

配列番号 : 9

配列の長さ : 1558

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ラファナスサティバス (Raphanus sativus L.)

組織の種類 : 葉

直接の起源

ライブラリー名 : 緑葉RNA 由来 λ ZAP II cDNAライブラリー

クローン名 : pPFK-RS1

配列

TCT GTT GTT AAG CAG TAC TTC GTT GAT GAG GAT GAC ACG GTT CCT CAG	48
Ser Val Val Lys Gln Tyr Phe Val Asp Glu Asp Asp Thr Val Pro Gln	
1                      5                      10                      15	
AAG ATC GTT GTT CAT CCT GAT AGT CCA AGA GGA ACA CAT TTC CGC AGA	96
Lys Ile Val Val His Pro Asp Ser Pro Arg Gly Thr His Phe Arg Arg	
20                      25                      30	
GCA GGA CCA CGT CAA AGG GTT TAC TTT GAT TCG GAT GAT GTT GTT GCG	144
Ala Gly Pro Arg Gln Arg Val Tyr Phe Asp Ser Asp Asp Val Val Ala	
35                      40                      45	
TGC ATT GTT ACA TGT GGT GGC TTG TGT CCA GGG CTT AAT ACT GTC ATC	192
Cys Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Leu Asn Thr Val Ile	

500 505 510  
 Leu Thr Ser Thr Gly Gln Pro Asp Phe His  
 515 520

配列番号 : 9

配列の長さ : 1558

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

生物名 : ラファナスサティバス (Raphanus sativus L. )

組織の種類 : 葉

直接の起源

ライブラリー名 : 緑葉RNA 由来 λ ZAP II cDNAライブラリー

クローン名 : pPFK-RS1

配列

TCT GTT GTT AAG CAG TAC TTC GTT GAT GAG GAT GAC ACG GTT CCT CAG	48
Ser Val Val Lys Gln Tyr Phe Val Asp Glu Asp Asp Thr Val Pro Gln	
1 5 10 15	
AAG ATC GTT GTT CAT CCT GAT AGT CCA AGA GGA ACA CAT TTC CGC AGA	96
Lys Ile Val Val His Pro Asp Ser Pro Arg Gly Thr His Phe Arg Arg	
20 25 30	
GCA GGA CCA CGT CAA AGG GTT TAC TTT GAT TCG GAT GAT GTT GTT GCG	144
Ala Gly Pro Arg Gln Arg Val Tyr Phe Asp Ser Asp Asp Val Val Ala	
35 40 45	
TGC ATT GTT ACA TGT GGT GGC TTG TGT CCA GGG CTT AAT ACT GTC ATC	192
Cys Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Leu Asn Thr Val Ile	

50	55	60	
AGA GAA ATC GTT TGT GGA TTG TCT TAC ATG TAT GGT GTC AAG AAA ATC			240
Arg Glu Ile Val Cys Gly Leu Ser Tyr Met Tyr Gly Val Lys Lys Ile			
65	70	75	
CTT GGC ATT GAG GGA GGT TAC AGA GGC TTC TAC GCT AGG AAC ACG ATC			288
Leu Gly Ile Glu Gly Gly Tyr Arg Gly Phe Tyr Ala Arg Asn Thr Ile			
80	85	90	
GAT TTG GAT TTG AAA ACA GTG AAT GAT ATT CAT AAA CGT GGA GGA ACC			336
Asp Leu Asp Leu Lys Thr Val Asn Asp Ile His Lys Arg Gly Gly Thr			
95	100	105	
ATC CTC GGG ACT TCA AGA GGT GGT CAC GAC ACT ACT AAG ATA GTT GAT			384
Ile Leu Gly Thr Ser Arg Gly Gly His Asp Thr Thr Lys Ile Val Asp			
110	115	120	
AGT ATT CAA GAT CGT GGG ATT AAC CAG GTT TAT ATA ATC GGT GGA GAT			432
Ser Ile Gln Asp Arg Gly Ile Asn Gln Val Tyr Ile Ile Gly Gly Asp			
125	130	135	
GGA TCA CAG AAA GGA GCA GCT GTT ATA TTC GAG GAG ATT AGG AGA CGT			480
Gly Ser Gln Lys Gly Ala Ala Val Ile Phe Glu Glu Ile Arg Arg Arg			
140	145	150	155
GGA CTC AAA GTT GCT GTT GCA GGG ATC CCC AAA ACA ATC GAC AAT GAC			528
Gly Leu Lys Val Ala Val Ala Gly Ile Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp			
160	165	170	
ATT CCT ATT ATC GAT AGA TCG TTC GGG TTT GAC ACA GCT GTA GAA GAG			576
Ile Pro Ile Ile Asp Arg Ser Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu Glu			
175	180	185	
GCT CAA CGT GCT ATC AAC GCA GCT CAT GTG GAA GCT ACA AGT TTT GAG			624
Ala Gln Arg Ala Ile Asn Ala Ala His Val Glu Ala Thr Ser Phe Glu			
190	195	200	
AAT GGT ATT GGT CTT GTC AAG TTA ATG GGA CGT TAT AGT GGA TTC ATT			672

Asn Gly Ile Gly Leu Val Lys Leu Met Gly Arg Tyr Ser Gly Phe Ile  
 205 210 215  
 GCG ATG TAT GCA ACA CTA GCC AGC AGA GAC GTG GAC TGC TGC TTG ATC 720  
 Ala Met Tyr Ala Thr Leu Ala Ser Arg Asp Val Asp Cys Cys Leu Ile  
 220 225 230 235  
 CCG GAA TCT CCA TTT TTT CTT GAA GGC AAA GGC GGT CTT TTC GAG TTT 768  
 Pro Glu Ser Pro Phe Phe Leu Glu Gly Lys Gly Gly Leu Phe Glu Phe  
 240 245 250  
 ATC GGT AAA CGG CTA AAG GAG ATT GGT CAC ATG GTG ATT GTG ATA GCA 816  
 Ile Gly Lys Arg Leu Lys Glu Ile Gly His Met Val Ile Val Ile Ala  
 255 260 265  
 GAA GGT GCT GGA CAA GAT CTG TTG GCT GAA AGC AAT GAA CAG TCC ACA 864  
 Glu Gly Ala Gly Gln Asp Leu Leu Ala Glu Ser Asn Glu Gln Ser Thr  
 270 275 280  
 ACC CTC AAA GAT GCA TCT GGG AAC AAA CTT CTA CAA GAC GTT GGC CTA 912  
 Thr Leu Lys Asp Ala Ser Gly Asn Lys Leu Leu Gln Asp Val Gly Leu  
 285 290 295  
 TGG ATC TCC CAA CGG ATC AAG GAT CAT TTT GCC AAG AAG ATG ACC CTA 960  
 Trp Ile Ser Gln Arg Ile Lys Asp His Phe Ala Lys Lys Met Thr Leu  
 300 305 310 315  
 AAC CTG AAA TAC ATA GAT CCA ACC TAC ATG ATA AGG GCT GTT CCG AGC 1008  
 Asn Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met Ile Arg Ala Val Pro Ser  
 320 325 330  
 AAT GCA TCA GAC AAT GTA TGC TGC ACG CTG TTA GCT CAA AGC GCG GTT 1056  
 Asn Ala Ser Asp Asn Val Cys Cys Thr Leu Leu Ala Gln Ser Ala Val  
 335 340 345  
 CAT GGA GTG ATG GCT GGT TAC AAT GGC TTC ACC GTT GGT CTT GTT AAT 1104  
 His Gly Val Met Ala Gly Tyr Asn Gly Phe Thr Val Gly Leu Val Asn  
 350 355 360

```

GGC AGA CAT ACT TAC ATT CCC TTC TAT AGG ATC ACT GAG AAA CAG AAC 1152
Gly Arg His Thr Tyr Ile Pro Phe Tyr Arg Ile Thr Glu Lys Gln Asn
      365              370              375

AAG GTG GTG ATC ACT GAC AGA ATG TGG GCA AGG CTT TTG TCT TCG ACA 1200
Lys Val Val Ile Thr Asp Arg Met Trp Ala Arg Leu Leu Ser Ser Thr
      380              385              390              395

AAC CAG CCT AGT TTC ATG AAG CAC GAT GAT CAC CAC GAG CCA AAC CAT 1248
Asn Gln Pro Ser Phe Met Lys His Asp Asp His His Glu Pro Asn His
              400              405              410

TCT GGT GGT GAA GCA GGT GCC ATG AAC TGG TGAAACAAC CTTGTCTGAC 1298
Ser Gly Gly Glu Ala Gly Ala Met Asn Trp
              415              420

AATCATTTTG TTTGAGAAAG AAAGTAAGGT TTCTTTATTT TGATAGAAGC TTCTCAAAAT 1358
GTTTTATAAA TCTTTCTTCA AGCAAAAGAG AAAGAGAGAG ATATACATTT CCTCCTTGGA 1418
GAAGTTCATA CAGTTATAAT TGTGATAAAT CCATGTATTA AACTTTGGAG AGTGATCTTG 1478
CACTTGCCAA ACTGTAATTT ACACTTTTAT AATAACAAAT CTATAAGGAA ATGTTTGGT 1538
TCAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1558

```

配列番号 : 10

配列の長さ : 421

配列の種類 : アミノ酸

配列

```

Ser Val Val Lys Gln Tyr Phe Val Asp Glu Asp Asp Thr Val Pro Gln
  1              5              10              15

Lys Ile Val Val His Pro Asp Ser Pro Arg Gly Thr His Phe Arg Arg
              20              25              30

Ala Gly Pro Arg Gln Arg Val Tyr Phe Asp Ser Asp Asp Val Val Ala
              35              40              45

Cys Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Leu Asn Thr Val Ile

```



50	55	60	
Arg Glu Ile Val Cys Gly Leu Ser Tyr Met Tyr Gly Val Lys Lys Ile			
65	70	75	
Leu Gly Ile Glu Gly Gly Tyr Arg Gly Phe Tyr Ala Arg Asn Thr Ile			
80	85	90	
Asp Leu Asp Leu Lys Thr Val Asn Asp Ile His Lys Arg Gly Gly Thr			
95	100	105	
Ile Leu Gly Thr Ser Arg Gly Gly His Asp Thr Thr Lys Ile Val Asp			
110	115	120	
Ser Ile Gln Asp Arg Gly Ile Asn Gln Val Tyr Ile Ile Gly Gly Asp			
125	130	135	
Gly Ser Gln Lys Gly Ala Ala Val Ile Phe Glu Glu Ile Arg Arg Arg			
140	145	150	155
Gly Leu Lys Val Ala Val Ala Gly Ile Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp			
160	165	170	
Ile Pro Ile Ile Asp Arg Ser Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu Glu			
175	180	185	
Ala Gln Arg Ala Ile Asn Ala Ala His Val Glu Ala Thr Ser Phe Glu			
190	195	200	
Asn Gly Ile Gly Leu Val Lys Leu Met Gly Arg Tyr Ser Gly Phe Ile			
205	210	215	
Ala Met Tyr Ala Thr Leu Ala Ser Arg Asp Val Asp Cys Cys Leu Ile			
220	225	230	235
Pro Glu Ser Pro Phe Phe Leu Glu Gly Lys Gly Gly Leu Phe Glu Phe			
240	245	250	
Ile Gly Lys Arg Leu Lys Glu Ile Gly His Met Val Ile Val Ile Ala			
255	260	265	
Glu Gly Ala Gly Gln Asp Leu Leu Ala Glu Ser Asn Glu Gln Ser Thr			
270	275	280	

Thr Leu Lys Asp Ala Ser Gly Asn Lys Leu Leu Gln Asp Val Gly Leu  
 285 290 295  
 Trp Ile Ser Gln Arg Ile Lys Asp His Phe Ala Lys Lys Met Thr Leu  
 300 305 310 315  
 Asn Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met Ile Arg Ala Val Pro Ser  
 320 325 330  
 Asn Ala Ser Asp Asn Val Cys Cys Thr Leu Leu Ala Gln Ser Ala Val  
 335 340 345  
 His Gly Val Met Ala Gly Tyr Asn Gly Phe Thr Val Gly Leu Val Asn  
 350 355 360  
 Gly Arg His Thr Tyr Ile Pro Phe Tyr Arg Ile Thr Glu Lys Gln Asn  
 365 370 375  
 Lys Val Val Ile Thr Asp Arg Met Trp Ala Arg Leu Leu Ser Ser Thr  
 380 385 390 395  
 Asn Gln Pro Ser Phe Met Lys His Asp Asp His His Glu Pro Asn His  
 400 405 410  
 Ser Gly Gly Glu Ala Gly Ala Met Asn Trp  
 415 420

配列番号: 11

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

配列

Arg Ala Gly Pro Arg

1 5

配列番号: 12

配列の長さ: 12

配列の型: アミノ酸

## 配列

Ile Val Thr Cys Gly Gly Leu Cys Pro Gly Leu Asn  
1 5 10

配列番号: 13

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

## 配列

Gly Tyr Arg Gly Phe  
1 5

配列番号: 14

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

## 配列

Ile Val Asp Ser Ile Gln  
1 5

配列番号: 15

配列の長さ: 8

配列の型: アミノ酸

## 配列

Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Ile  
1 5

配列番号: 16

配列の長さ: 8

配列の型: アミノ酸

## 配列

Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val Glu

1

5

配列番号: 17

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

配列

Ala Gln Arg Ala Ile Asn

1

5

配列番号: 18

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

配列

Val Lys Leu Met Gly Arg

1

5

配列番号: 19

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

配列

Ser Gly Phe Ile Ala

1

5

配列番号: 20

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

配列

Ala Glu Gly Ala Gly Gln

1 5

配列番号: 21

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

配列

Asp Ala Ser Gly Asn

1 5

配列番号: 22

配列の長さ: 9

配列の型: アミノ酸

配列

Leu Lys Tyr Ile Asp Pro Thr Tyr Met

1 5

配列番号: 23

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

配列

Cys Leu Ile Pro Glu

1 5

## 請求の範囲

1. 植物由来のATP依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼをコードするDNA。
2. 5℃でのQ10値が2.4以下である植物由来のATP依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼをコードする請求項1記載のDNA。
3. 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする請求項1記載のDNA。
4. 配列表の配列番号1で示される塩基配列を有する請求項3記載のDNA。
5. 配列表の配列番号4で示されるアミノ酸配列をコードする請求項1記載のDNA。
6. 配列表の配列番号3で示される塩基配列を有する請求項3記載のDNA。
7. 配列表の配列番号6で示されるアミノ酸配列をコードする請求項1記載のDNA。
8. 配列表の配列番号5で示される塩基配列を有する請求項7記載のDNA。
9. 配列表の配列番号8で示されるアミノ酸配列をコードする請求項1記載のDNA。
10. 配列表の配列番号7で示される塩基配列を有する請求項9記載のDNA。
11. 配列表の配列番号10で示されるアミノ酸配列をコードする請求項1記載のDNA。
12. 配列表の配列番号9で示される塩基配列を有する請求項11記載のDNA。
13. 配列表の配列番号11で示されるアミノ酸配列をコードするDNA。
14. 配列表の配列番号14で示されるアミノ酸配列をコードするDNA。
15. 配列表の配列番号21で示されるアミノ酸配列をコードするDNA。
16. 配列表の配列番号22で示されるアミノ酸配列をコードするDNA。
17. 配列表の配列番号11ないし22で示されるアミノ酸又はその一部をコードするDNA及び配列表の配列番号11ないし22で示されるアミノ酸配列をコードするDNAを含むDNAのいずれかと試料DNAとをハイブリダイズさせることから成る、植物由来のATP依存フルクトース6リン酸1ホスホトランス

フェラーゼ遺伝子の検出方法。

18. 配列表の配列番号11ないし22で示されるアミノ酸又はその一部をコードするDNA及び配列表の配列番号11ないし22で示されるアミノ酸配列をコードするDNAを含むDNAのいずれかをPCRのためのプライマーとして用いて植物由来のATP依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼ遺伝子を増幅する方法。

19. 請求項1ないし12のいずれか1項に記載のDNAを含み、宿主細胞内で植物由来のATP依存フルクトース6リン酸1ホスホトランスフェラーゼを発現することができる組換えベクター。

20. 請求項19記載の組換えベクターで植物を形質転換することから成る、低温下で植物細胞中の糖含量を変化させる方法。

21. 前記植物はバレイショである請求項20記載の方法。

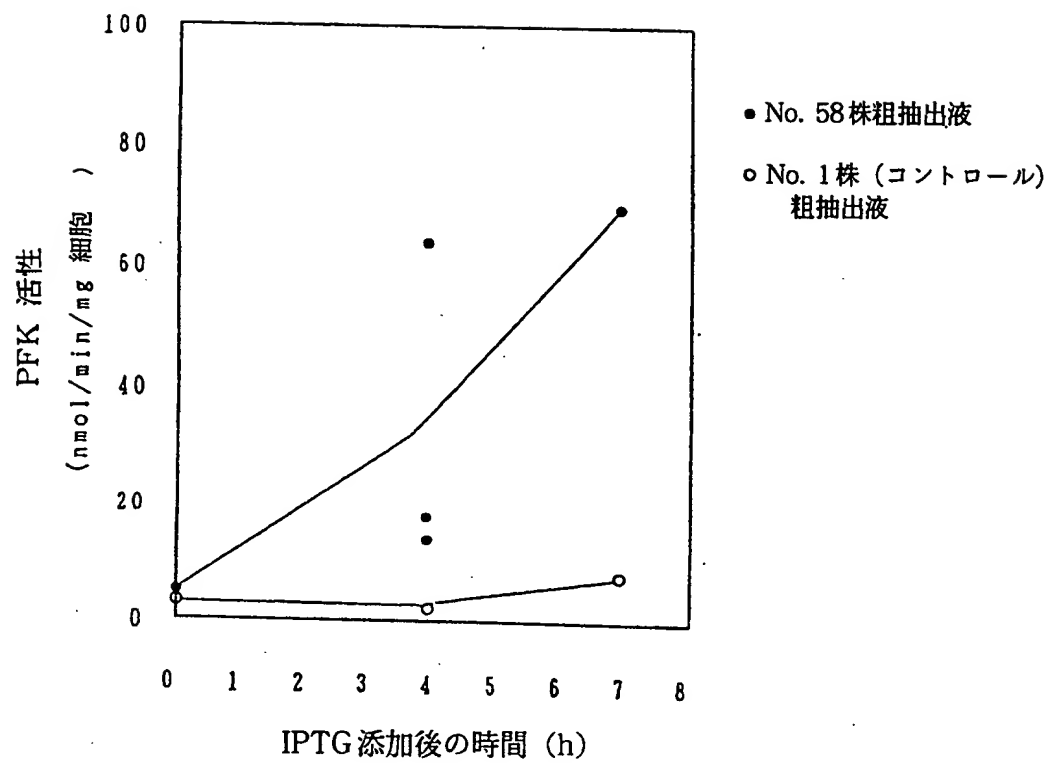


図 1



2/6

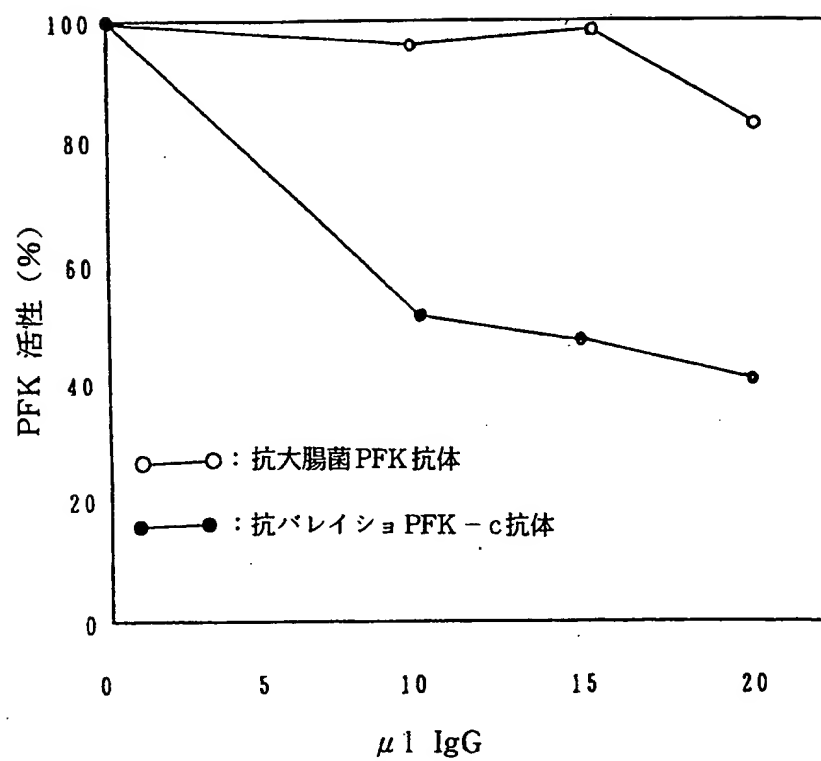
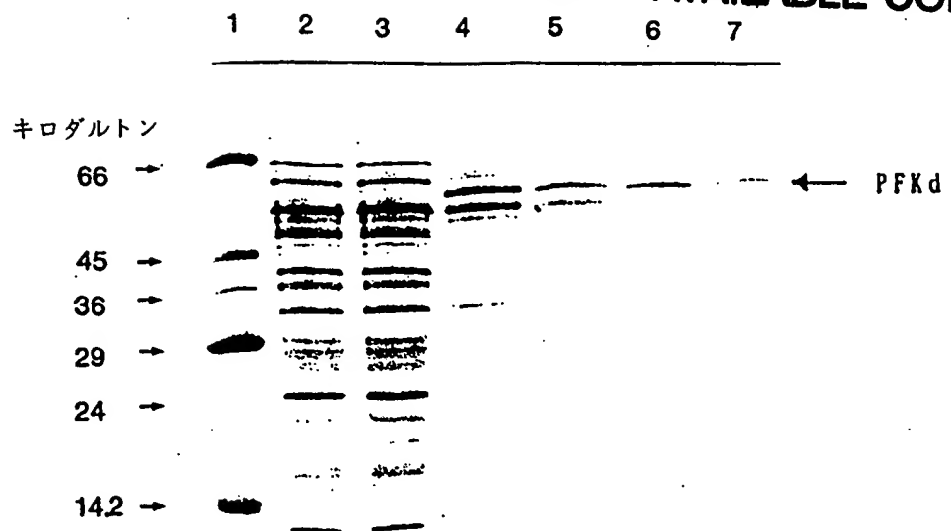
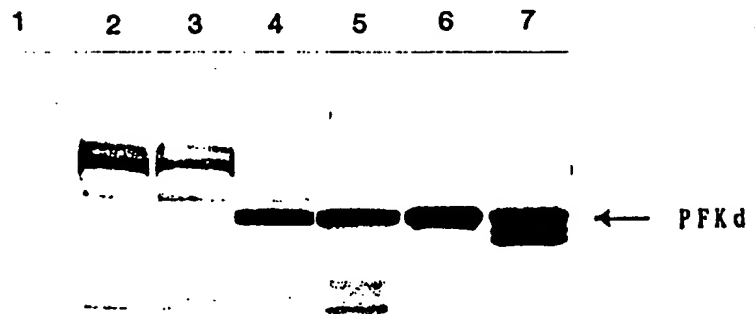


図2

A : CBB 染色

BEST AVAILABLE COPY

B : ウェスタンブロット解析  
(抗パレイショ PFK - c抗体)

レーン 1 : 分子量マーカー

2,3 : 大腸菌 XL1 - Blue 粗抽出液

4 : シバクロンブルーアガロース精製後 (フロースルー)

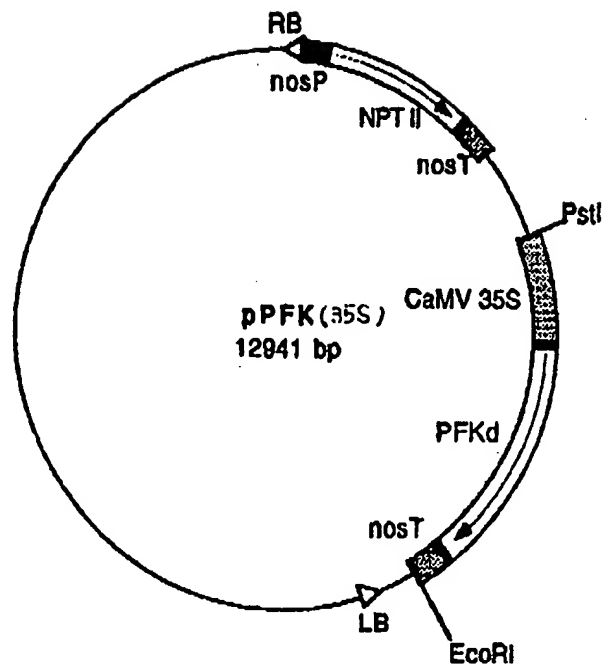
5 : リアクティブレッド 120 - アガロース精製後 (KCl 溶出)

6 : モノ Q 精製後

7 : パレイショ塊茎から精製した PFK

図 3

BEST AVAILABLE COPY



RB, LB: アグロバクテリウム・ツメファシエンスのT-DNAの左右境界領域

nosP: アグロバクテリウム・ツメファシエンスのノバリンシンターゼ遺伝子のプロモーター (0.3 kb)

NPTII: カナマイシン抵抗性を与えるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子 (1.2 kb)

nosT: アグロバクテリウム・ツメファシエンスのノバリンシンターゼのポリアデニレーションシグナル (0.3 kb)

CaMV 35S: カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター (0.8 kb)

PFKd: バレイショ品種 Brodick の低温耐性 PFK 遺伝子 (1.8 kb)

BEST AVAILABLE COPY

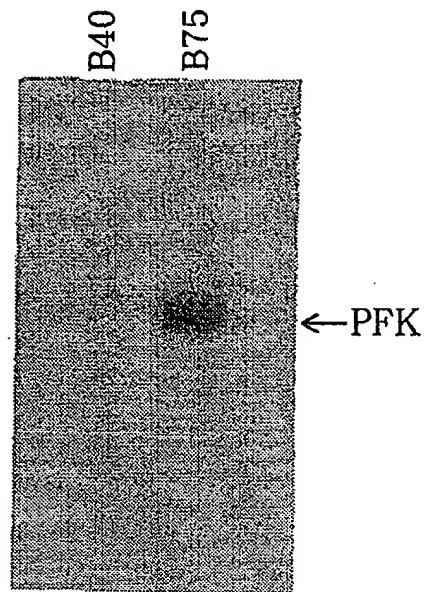


図5

BEST AVAILABLE COPY

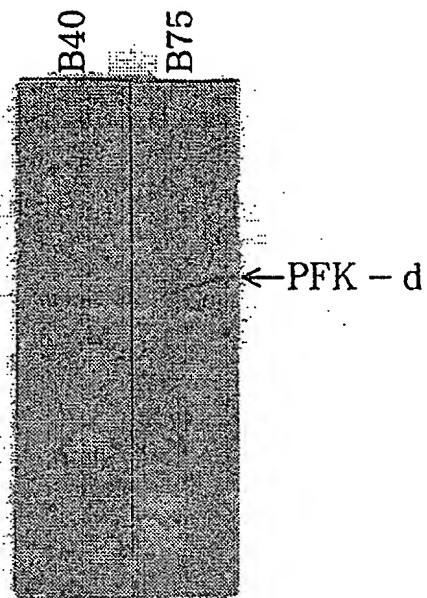


図 6

差替え用紙 (規則26)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01352

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1<sup>6</sup> C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1<sup>5</sup> C12N15/55, C12N9/12, C12N15/63

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS BIOSIS WPI, WPI/L

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. Biol. Chem., Vol. 26, No. 30, (1990) Sara M. Carlisle et al. "Pyrophosphate-dependent Phosphofructokinase", P. 18366-18371	1, 19, 20
X	Plant. Physiol., Vol. 99, No. 3, (1992) Blakeley S.D. et al. "Expression of the genes for the alpha and beta-subunits of phosphofructokinase in germinating and developing seeds from Ricinus-Communis", P. 1245-1250	1, 19, 20
A	Planta, Vol. 180, No. 4, (1990) Hammond J.B.W. et al. "Effect of low temperature on the activity of phosphofructokinase from Potato tubers", P. 613-616	2, 20, 21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

November 1, 1994 (01. 11. 94)

Date of mailing of the international search report

November 22, 1994 (22. 11. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/55, C12N9/12, C12N15/63

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS BIOSIS WPI, WPI/L

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J. Biol. Chem., 第265巻, 第30号, (1990) Sara M. Carlisle et al. [Pyrophosphate- dependent Phosphofructokinase] p.18366-18371	1, 19, 20
X	Plant. Physiol., 第99巻, 第3号, (1992) Blakeley S. D et al. [Expression of the genes for the alpha and beta-subunits of phrophosphate-dependent. phosphofructo-	1, 19, 20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.11.94

国際調査報告の発送日

22.11.94

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

種 村 慈 樹

4 B

9 3 5 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	<p>kinase in germinating and developing seeds from Ricinus-Communis] p.1245-1250</p> <p>Planta, 第180巻, 第4号, (1990) Hammond J. B. W. et al. [Effect of low temperature on the activity of phosphofructokinase from Potato tubers] p.613-616</p>	2, 20, 21